

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

ROSIMEIRE TAKAKI ROSA

**Detecção do polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados
de indivíduos livres de cárie (CPOD = 0)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do grau de
mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.**

Piracicaba, SP

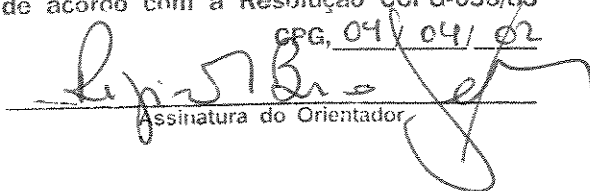
2001

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ROSIMEIRE TAKAKI ROSA

**Detecção do polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados
de indivíduos livres de cárie (CPOD = 0)**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/88

CPG, 04/04/02

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do grau de
mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientador:

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidório

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Piracicaba, SP

2001

NIDADE BR
CHAMADA T/UNICAMP
R71d
EX
OMBO BC/ 49183
ROC 06.837/00
DX
REÇO R\$ 11,00
ATA
CPD

CM00167683-9

IB 10 241023

Ficha Catalográfica

R71d

Rosa, Rosimeire Takaki.

Detecção do polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (CPOD = 0). / Rosimeire Takaki Rosa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
ix, 85f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Isoenzimas. 2. Eletroforese. 3. Análise enzimática. 4. Microbiologia. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 14 de Dezembro de 2001, considerou a candidata ROSIMEIRE TAKAKI ROSA aprovada.

1. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

2. Profa. Dra. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

3. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

0222802

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

**Aos meus pais, Jorge (*in memoriam*) e Mizuê
e minhas irmãs Roseli, Regina Márcia e Luciana,
que sempre torceram pela minha realização profissional.**

**Ao meu Edvaldo, que com carinho,
compreensão e incentivo, foi o alicerce
para as minhas conquistas.**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

**Ao meu orientador, Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves
com toda admiração e gratidão, meus sinceros agradecimentos
pela orientação segura na minha formação científica
e pela nossa amizade cultivada no transcorrer deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Reitor Prof. Dr. Hermano de Medeiros Ferreira Tavares e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Diretor Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP, na pessoa da Coordenadora Profª. Dra. Altair A. Del Bel Cury e das secretárias Érica A. Pinho e Sônia M. L. Arthur, pela pronta atenção dispensada.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental Profª. Dra. Darcy O. Tosello, pela presteza na condução do processo de tramitação deste trabalho.

Aos professores da FOP, especialmente aos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental, pela positiva participação na minha formação.

Aos examinadores que compuseram a banca de tese, Profª. Dra. Denise M. P. Spolidório, Prof. Dr. José Francisco Höfling e Prof. Dr. Edvaldo A. R. Rosa, pela análise e avaliação deste trabalho.

À Profª. Dra. Denise M. P. Spolidório e ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório, pelo incentivo, amizade e sincera disposição com que me ajudaram.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling que me acolheu com imenso carinho no Laboratório de Microbiologia e Imunologia e me ofereceu as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso P. da Costa (FOP) , pela amizade e incentivo durante estes anos de convívio.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia,, Anderson L. Teixeira e Wilma C. Ferraz pela disposição com que me auxiliaram e principalmente pela amizade desenvolvida ao longo desse tempo.

Aos meus amigos do curso de Pós-Graduação Cássio V. Pereira, Marcelo F. G. Boriollo, Wagner L. C. Bernardo, Iriana Zanin, Marlize Klein, Regianne U. Kamiya, Ana Cláudia B. A. Alves, Rita C. Mardegan, Flávia Flório, Janaina A. O. Rodrigues, Marcelle M. Nascimento, Marcelo H. Napimoga, Rafael N. Stipp, Carolina Steiner, Fernando Maciel e Magda B. Gouvêa que dividiram comigo as conquistas e também as dificuldades durante a realização deste trabalho.

À Marilene Girello e Heloisa M. Ceccotti bibliotecárias da FOP, pela orientação e revisão deste trabalho de tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos concedidos para realização deste trabalho (Processos nº 99/05183-7 e 99/09393-6).

Aos meus voluntários, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho nesses anos.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	1
Lista de Tabelas	4
Lista de Gráficos	5
Resumo	6
Abstract	7
1 Introdução	8
2 Revisão de Literatura	11
3 Proposição	24
4 Material e Métodos	25
5 Resultados	36
6 Discussão	59
7 Conclusões	65
Referências Bibliográficas	66
Anexo	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	“Janela de infectividade” proposta por Caufield <i>et al.</i> [J. Dent. Res. 70 (Special Issue):367, 1991] e Caufield <i>et al</i> [J. Dent. Res. 72(1):37-45, 1993]	... 18
Figura 2	Tubo plástico com rosca (2mL) empregado na extração de proteínas de <i>Streptococcus mutans</i> . Tampão Fosfato ($\cong 250\mu\text{L}$); pérola de vidro ($\cong 500\text{mg}$); massa celular ($\cong 500\text{mg}$)	... 30
Figura 3	Disruptor de células BeadBeater® (Biospec Products, Inc.)	... 30
Figura 4	Centrífuga refrigerada HAWK 15/05 Mod. MSB005.CR2.H (SANYO Gallenkamp PLC)	... 30
Figura 5	Solução protéica ($\cong 250\mu\text{L}$) armazenada em tubos Eppendorf (1,5mL) a -70°C	... 30
Figura 6	Wicks embebidos em solução protéica ($\cong 25\mu\text{L}$) e armazenada em Eppendorf (1,5mL) a -70°C	... 30
Figura 7A	Frasco de Erlenmeyer (1000mL) contendo Penetrose 30® a 13% em tampão 1:30 Tris-citrato (TC) pH 8,0	... 31
Figura 7B	Forno Microondas M-34 (CCE Eletrodomésticos S/A)	... 31
Figura 7C	Gel de amido após o cozimento	... 31
Figura 8A	Molde de acrílico (200x120x10mm) sobre uma base de vidro regulável	... 32
Figura 8B	Gel de amido em molde de acrílico	... 32
Figura 9	Aplicação da amostra e azul de bromofenol em gel de amido	... 32
Figura 10	Sistema de corrida eletroforética para isoenzimas (gel de amido apoiado sobre as cubas e conectado através de ponte de tecido)	... 33
Figura 11	Sistema de laminação do gel de amido. Mesa de acrílico, régua (1,5mm de espessura) e fio para pesca nº 15	... 33
Figura 12	Gel de amido em lâmina pronta para coloração	... 33

Figura 13	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário A	... 41
Figura 14	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário C	... 42
Figura 15	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário D	... 43
Figura 16	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário E	... 44
Figura 17	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário G	... 45
Figura 18	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário I	... 46
Figura 19	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário O	... 47
Figura 20	Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT para isolados de <i>Streptococcus mutans</i> obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário R	... 48
Figura 21	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário A, determinados pela MLEE	... 49

Figura 22	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C, determinados pela MLEE	... 50
Figura 23	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário D, determinados pela MLEE	... 51
Figura 24	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário E, determinados pela MLEE	... 52
Figura 25	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário G, determinados pela MLEE	... 53
Figura 26	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário I, determinados pela MLEE	... 54
Figura 27	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário O, determinados pela MLEE	... 55
Figura 28	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário R, determinados pela MLEE	... 56
Figura 29	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos de <i>Streptococcus mutans</i> ocorrendo nas cavidades bucais dos voluntários determinadas pela MLEE	... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios para determinação bioquímica das espécies de estreptococos grupo mutans	... 26
Tabela 2	Distribuição e frequência de amostras de <i>Streptococcus</i> do grupo mutans isoladas de diferentes nichos da cavidade oral de voluntários livres de cárie	... 36
Tabela 3	Total de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> analisadas pela MLEE e o total de perfis genéticos encontrados em 8 voluntários	... 58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição e frequência de <i>Streptococcus</i> do grupo mutans de voluntários livres de cárie nos nichos pesquisados	... 36
-----------	---	--------

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo analisar a variabilidade infraespecífica de cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de indivíduos livres de cárie. Foram coletadas amostras de saliva total não estimulada, placa dental e de dorso de língua de indivíduos que apresentavam índice CPOD igual a zero. Após dispersão e diluição seriada das amostras, alíquotas de cada diluição foram inoculadas em meio Mitis Salivarius Bacitracina Agar (MSB). Após incubação em estufa de pCO₂ 10% a 37°C, foram isoladas do meio colônias com morfologia típica de estreptococos, para posterior identificação por provas bioquímicas. As amostras foram incubadas em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI), centrifugadas e lavadas, sendo os sedimentos obtidos submetidos ao processo de extração das proteínas intracelulares. Os extratos protéicos foram separados por eletroforese em gel de amido e corados especificamente para a detecção do polimorfismo isoenzimático. Os géis foram analisados através dos sistemas enzimáticos: leucina aminopeptidase (LAP), manitol 1-fosfato desidrogenase (MIP), manose fosfato isomerase (MPI), nucleosídeo fosforilase (NSP), fenilalanil leucina peptidase (PLP) e transaminase glutâmico-oxalacética (GOT). A análise comparativa dos perfis da eletroforese de isoenzimas (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*-MLEE) dos isolados, acessada pela soma de todos sistemas enzimáticos, permitiu observar a ocorrência de dois ou mais clones de *S. mutans* nos diferentes sítios nestes voluntários. Os resultados obtidos mostram que pode ser encontrado mais de um tipo genético de *S. mutans* colonizando os diferentes sítios em um mesmo indivíduo.

ABSTRACT

The current research had as aim to analyze the infra-specific variability of *Streptococcus mutans* strains obtained from caries-free individuals. Non-stimulated whole saliva, dental biofilm and tongue dorsum samples were collected from subjects with DMFT = 0. After dispersing and decimal dilutions, aliquots from each dilution were inoculated in Mitis Salivarius Bacitracin (MSB) agar plates, in duplicate. After growing at pCO₂ 10% and 37°C, it was taken some *S. mutans* suspect colonies that were biochemically identified. *S. mutans*-positive colonies were grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth, they were centrifuged and washed. The pellets were submitted to cell disruption and protein extraction. Protein extracts were separated by starch gel electrophoresis and specifically stained in order to obtain the isoenzymic polymorphism. The gels were analyzed for enzymatic systems: leucine amino peptidase (LAP), mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1P), mannose phosphate isomerase (MPI), nucleoside phosphorylase (NSP), phenylalanyl leucine peptidase (PLP) e glutamic-oxalacetic transaminase (GOT). The comparative analysis of MLEE profiles assessed by the sum of all enzymatic systems allowed the observation of occurrence of one or more *S. mutans* clones, varying in the different intra oral sites among these volunteers. The obtained results showed that it may be found more than one genetic type of such *S. mutans* colonizing different sites in a same subject.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma das doenças infecciosas mais comuns, podendo ser observada nas mais diversas comunidades, etnias e nações (van PALESTEIN-HELDERMAN *et al.*, 1996). A etiologia da doença cárie é multifatorial (KEYES, 1962), sendo os hábitos de vida e a infecção bacteriana os fatores de maior importância (JOHNSON, 1991; BRATTHALL, 1997).

O fato de que os “estreptococos grupo mutans” constituem a principal porção da microbiota envolvida nos mais variados processos cariogênicos já está firmemente consolidado, conforme a ampla aceitação por parte da comunidade acadêmica (ZICKERT *et al.*, 1983; TANZER, 1995; van PALESTEIN-HELDERMAN *et al.*, 1996; CAUFIELD, 1997). Dentre os diferentes membros desse grupo, as espécies melhor representativas do potencial patogênico são, sem sombra de dúvidas, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus* (PEREIRA *et al.*, 2000).

Duas ou mais espécies desses estreptococos cariogênicos, podem ocorrer num mesmo indivíduo (DAVEY & ROGERS, 1984; MARCOTTE & LAVOIE, 1998). Assim como mais de um tipo clonal dessas bactérias pode ser isolado da cavidade bucal (CAUFIELD *et al.*, 1988). Contudo, até a presente data a informação disponível sobre tal fenômeno é relativamente escassa, e dados acerca da variabilidade genética para essa bactéria acessada junto a indivíduos livres de cárie com índices CPOD iguais a zero é praticamente inexistente.

Numa das poucas publicações que abordam a problemática da clonalidade, ALALUUSUA *et al.* (1996) demonstram a ocorrência de diversos clones bacterianos durante eventos de presença de lesões ativas de “cárie de mamadeira”, ao passo que

crianças livres de cárie apresentaram menores graus de variabilidade genética para a mesma bactéria. Um ano mais tarde, KREULEN *et al.* (1997) contestaram esse achado e levantaram uma questão acerca da composição clonal das populações de *Streptococcus mutans* em indivíduos livres de cárie: “Será que somente uma cepa de *Streptococcus mutans* na microbiota fornece uma condição não cariogênica ou será que várias cepas, geneticamente distintas, garantem uma placa bacteriana não patogênica estável”?

As pesquisas nesse campo têm sido dirigidas na compreensão da composição clonal das populações de *Streptococcus mutans* em indivíduos cárie-ativos, como no exemplo da recente publicação de GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000), onde os mesmos descrevem a ocorrência de um número variável de clones da bactéria nos diferentes dentes de um mesmo indivíduo. Dentre as diferentes metodologias que permitem o acesso ao polimorfismo infraespecífico e a determinação de clones microbianos, a *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), também conhecida como eletroforese de enzimas constitutivas, é um dos recursos que têm se mostrado mais úteis na pesquisa envolvendo bactérias (SELANDER & LEVIN, 1980; SELANDER *et al.*, 1985; MUSSER *et al.*, 1986; HÖFLING *et al.*, 1997), fungos leveduriformes (HÖFLING & ROSA, 1999; ROSA *et al.*, 1999; ROSA *et al.*, 2000a; ROSA *et al.*, 2000b) e mesmo protozoários (MELONI *et al.*, 1988).

A importância em se entender os padrões de clonalidade de *Streptococcus mutans* em indivíduos cárie-ativos e livres de cárie pode ser reconhecida quando analisamos o trecho de encerramento do artigo de revisão redigido por BOWDEN (1997): “Populações de *Streptococcus mutans* em indivíduos com altas contagens dessa espécie, mas isentos de cáries apresentam diversidade clonal típica em outras populações humanas? Pode ser

mostrado que diferentes clones num único indivíduo variam em características que podem influenciar sua habilidade de causar doença e sobreviver às pressões ambientais? A biodiversidade, em nível de espécies e sub-espécies, em relação às doenças bucais permanece entre as mais interessantes áreas da pesquisa em microbiologia oral”.

Tais considerações justificam as pesquisas com o propósito de responder essas várias questões ainda presentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A cárie dental é uma doença infecciosa (ZICKERT *et al.*, 1983) e transmissível (TANZER, 1995; CAUFIELD, 1997) caracterizada pela desmineralização dos tecidos não-descamantes que compõem o corpo dental, e que é provocada, principalmente, por bactérias com alta similaridade fenotípica classificadas como estreptococos grupo mutans, sendo que as espécies *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* são aquelas mais comumente envolvidas no processo cariogênico (LINDQUIST & EMILSON, 1991a). Essas bactérias expressam seu potencial patogênico toda vez que uma dieta rica em açúcares, em especial a sacarose, é ingerida (van PALESTEIN HELDERMAN *et al.*, 1996).

A transmissibilidade das bactérias envolvidas no desenvolvimento da cárie dental, em especial do *S. mutans*, é o alvo de extensiva investigação epidemiológica que tem levado vários grupos de pesquisadores à conclusões diversas e contrastantes.

Após o estabelecimento do conceito de que são os estreptococos as primeiras entidades cariogênicas a se estabelecer no homem (FITZGERALD & KEYES, 1960; KEYES, 1962), iniciou-se uma corrida global em busca do pleno conhecimento acerca da transmissão desses microrganismos. KORESTEIN *et al.* (1995) apontam para o fato de que as vias de infecção devem seguir algumas constantes tais como: (1) tamanho do inóculo bacteriano; (2) frequência de transferência desse inóculo; (3) habilidade das células bacterianas em aderir às superfícies dentais; e (4) variáveis do hospedeiro.

Os primeiros esforços dirigidos no sentido de se compreender as vias de infecção basearam-se em indicadores de saúde dental tais como índices de cárie e contagens de estreptococos cariogênicos (KÖHLER & BRATTHAL, 1978; van HOUTE *et al.*, 1981; KÖHLER *et al.*, 1983; ZICKERT *et al.*, 1983; KÖHLER *et al.*, 1984; BROWN *et al.*,

1985; MATEE *et al.*, 1992; AALTONEN & TENOVUO, 1994; ANTHONY & MUNSHI, 1997) e todos concluíram que a via mais provável de transmissão dessas bactérias ocorria nos pares mãe-filho (bebê) e mãe-filho (adolescente) (ALALUUSUA *et al.*, 1989a; ALALUUSUA *et al.*, 1989b), embora existam eventuais variações em diferentes grupos étnicos (KORESTEIN *et al.*, 1995).

Estudos mais específicos envolveram o emprego de ferramentas que permitiam a classificação dos estreptococos grupo mutans em sub-grupos antigenicamente relacionados (BRATTHALL, 1970; BRATTHALL, 1997). Através desse recurso, KÖHLER & BRATTHALL (1978) mostraram que um dos pais ou outra pessoa que tomasse conta da criança na maioria do tempo e que apresentasse altos números de estreptococos de um dado sorotipo na saliva, podia transferir esse mesmo microrganismo para seu filho através da repetida introdução de algumas centenas de unidades formadoras de colônias por meio de colheres, copos e outros fômites. Nesse mesmo contexto, HAMADA *et al.* (1980) puderam prever que um mesmo sorotipo tendia a ocorrer simultaneamente em pares mãe-filho e que essa transmissão podia ser veiculada repetidamente pela saliva.

Contudo, a sorotipagem somente mostrava que uma mesma espécie estava implicada nesses casos, pois hoje é sabido que sub-grupos antigenicamente relacionados na realidade podem corresponder à diferentes espécies. DAVEY & ROGERS (1984) já relataram que a sorotipagem de estreptococos grupo mutans para fins epidemiológicos é insatisfatória, particularmente porque o *S. mutans* sorotipo *c* é, de longe, o mais comum ocorrendo em adultos e crianças no Ocidente. Ferramentas com maior poder resolutivo passaram a ser avaliadas, e diversos grupos passaram então a empregar a

bacteriocinotipagem, que pode apresentar uma melhor capacidade de discriminação infraespecífica (DAVEY & ROGERS, 1984; ROGERS, 1980).

Bacteriocinas são substâncias proteináceas antibacterianas que algumas bactérias produzem para interferir no crescimento de outras bactérias, geralmente filogeneticamente relacionadas. No caso do *S. mutans*, as bacteriocinas são denominadas mutacinas.

Através da mutacinotipagem, ROGERS (1980) mostrou que a transmissão de *S. mutans* geralmente se dá dentro dos grupos familiares e não no ambiente escolar. Quando analisado mais atentamente, esse trabalho mostra ainda que crianças são infectadas com um dado mutacinentipo numa dada fase de sua infância e que esse microrganismo depois de estabelecido, permanece constante e predominante mesmo quando da inclusão/substituição de novos membros adultos às suas famílias. Em 1984, DAVEY & ROGERS mostraram que a bacteriocinotipagem permitiu determinar que em várias famílias analisadas, o pai não apresenta cepas em comum com os demais membros da família, e que a fonte mais provável de infecção intrafamiliar no plano vertical seria a mãe, que apresenta cepas em comum com os filhos.

GRÖNROOS *et al.* (1998) apontam para o fato de que as mutacinas, em virtude de suas propriedades biológicas de antagonismo seletivo, têm papel preponderante no processo de colonização e consolidação de uma cepa pioneira, e que cepas com alta produção dessas bacteriocinas são mais facilmente transmitidas de um adulto para uma criança que outras cepas com baixa atividade mutacínolítica. Talvez esse componente venha a explicar porque uma vez que os estreptococos grupo *mutans* tornem-se estabelecidos, eles são dificilmente eliminados da microbiota oral (ALALUUSUA, 1991).

Na busca de marcadores epidemiológicos menos sujeitos a interferência técnica e que possam detectar níveis mais sutis de polimorfismo, iniciaram-se alguns trabalhos envolvendo a procura de plasmídeos em *S. mutans*. CAUFIELD *et al.* (1982) propuseram que o plasmídeo críptico pVA318 (MACRINA *et al.*, 1977) de aproximadamente 5.6kb podia ser empregado como marcador epidemiológico, visto que o mesmo somente é encontrado em cerca de 13% das cepas de *S. mutans*. Os autores obtiveram que 40% das cepas plasmídeo-positivas isoladas de crianças apresentavam homologia com cepas isoladas de parentes (pais, irmãos, e tios), demonstrando a permanência e transmissão dessas cepas nas famílias. Anos mais tarde, CAUFIELD *et al.* (1988) empregaram o mesmo sistema numa amostragem mais ampla buscando o polimorfismo para um segundo plasmídeo críptico pUA140 (CAUFIELD *et al.*, 1985). Obtiveram que os diferentes plasmídeos permaneciam conservados em cepas de *S. mutans* oriundas de grupos raciais específicos, possivelmente coevoluindo com os mesmos. Esse estudo permitiu, ainda, determinar que cepas plasmídeo-positivas obtidas a partir de crianças apresentavam alta correlação com cepas isoladas de suas mães, o que reforçava a teoria da transmissão materna.

KULKARNI *et al.* (1989) obtiveram, através da técnica de REA (*restriction enzyme analysis* – análise de enzima de restrição), que existe uma tendência de se encontrar determinados clones de *S. mutans* disseminados entre os membros de uma família, sem, contudo, se excluir a possibilidade da ocorrência de outros clones extrafamiliares em alguns membros dessas famílias. Esse trabalho mostrou, ainda, que a frequência de isolamento dos clones intrafamiliares é superior a dos clones extrafamiliares, o que indica que eles são possivelmente os primeiros a colonizar os dentes levando a uma conseqüente

predominância numérica. Esse fato já havia sido anteriormente alentado por outros autores (KRASSE *et al.*, 1967; DAVEY & ROGERS, 1984; CAUFIELD *et al.*, 1988). Essa tendência de infecção primária intrafamiliar, contudo, não foi observada por EMANUELSSON *et al.* (1998) que acharam 5/11 casos de ocorrência de clones extrafamiliares em crianças suecas com 3 anos de idade, contra 6/11 casos de ocorrência simultânea de um mesmo clone nas crianças e suas mães.

O consenso ocidental de que a via mais comum de transmissão de estreptococos grupo mutans para crianças é aquela estabelecida entre a mãe e o bebê não é necessariamente o mesmo para determinadas populações, conforme apontam os achados de EMANUELSSON & WANG (1998). Esses autores realizaram um levantamento em onze famílias chinesas constituídas por ambos pais e uma criança e obtiveram que em 3/11 casos, o *S. mutans* do pai e da criança apresentavam o mesmo perfil REA contra 4/11 casos onde as cepas da mãe e da criança eram idênticas. Esse fato ganha maior interesse quando observa-se que todas as crianças que apresentavam o mesmo clone bacteriano que os pais receberam cuidados básicos até os 3 primeiros anos de idade dispensados pelas mães, e que os pais apresentavam menores níveis de colonização oral que as mães, no momento das coletas. No Japão, KOZAI *et al.* (1999) observaram que 36/70 genótipos obtidos a partir de estreptococos grupo mutans das crianças apresentavam homologia com suas mães, contra 22/70 genótipos que colonizavam pais e filhos. Os autores propõem que os pais, tanto quanto as mães, podem ser fontes primárias de infecção e que a espécie *S. sobrinus* (sorotipos *d* e *g*) mostrou maior probabilidade de transmissão que *S. mutans* (sorotipo *c*). Em outro estudo, conduzido na Finlândia por SAARELA *et al.* (1993), foi observado que 2 em 4 casais caucasianos com periodontite avançada, albergavam uma mesma cepa de *S.*

mutans além dos mesmos clones de *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, indicando co-infecção entre casais.

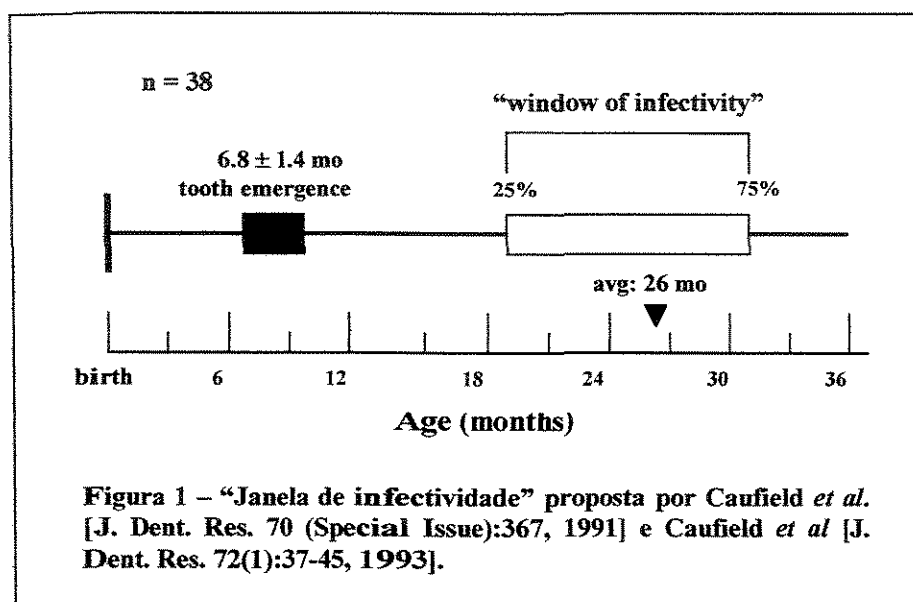
A teoria de que a infecção oral primária por estreptococos grupo *mutans* pode permanecer estável ao longo da infância, proposta inicialmente por ROGERS (1977) e por DAVEY & ROGERS (1984), foi experimentalmente comprovada por CAUFIELD & WALKER (1989) que, empregando a técnica de REA, relataram a aquisição, por parte das crianças, de clones aparentemente predominantes nas mães e manutenção da estabilidade desses clones de *S. mutans* por mais de 3 anos. Anos mais tarde, ALALUUSUA *et al.* (1994) obtiveram amostras de *S. mutans* (sorotipos *c* e *f*) a partir de crianças finlandesas primeiramente com 5 anos de idade e das mesmas, 5 ou 7 anos após. Através da técnica de ribotipagem, os autores puderam observar que durante o intervalo entre os 5 e os 12 anos de idade não ocorrem alterações bruscas no tipo de *S. mutans* que coloniza a cavidade oral, com substituição ou introdução de novas linhagens, o que poderia ser explicado pela hipótese de que cepas já instaladas antes da idade de 5 anos tornam-se estabilizadas e permanentes.

Resultados contrastantes obtiveram EMANUELSSON & THORNQVIST (2000), num estudo semelhante, onde avaliaram a estabilidade e a variação clonal dos estreptococos grupo *mutans* em onze famílias suecas cujas crianças tinham 7 anos de idade no momento da primeira coleta e 9-12 anos de idade na época da segunda coleta. Mostraram que 9 crianças albergavam um ou dois clones constantes nas duas amostragens, sendo que algumas incorporaram um novo genótipo a sua microbiota ao passo que duas perderam o clone original. Nos adultos analisados, a perda ou substituição de clones foi mais comum (9/21 dos casos), indicando que a estabilidade clonal ocorre na maioria dos indivíduos,

muito embora alguns possam perder ou ganhar novos genótipos com o passar do tempo.

A idade na qual as crianças adquirem os estreptococos cariogênicos parece ser de fundamental importância visto que as mesmas permanecem estáveis por anos e que, se as mesmas produzirem fatores de inibição de crescimento que atuem sobre outras cepas que por ventura venham a colonizar tardiamente, permanecem sob o *status* de predominantes numéricos. A colonização primária esta intimamente relacionada com hábitos sociais tais como beijar bebês diretamente na boca, limpar ou umedecer chupetas ou bicos de mamadeiras, e dividir com o bebê um mesmo fômite (AALTONEN & TENOVUO, 1994). Contudo, tais hábitos parecem não contribuir efetivamente na colonização oral por estreptococos cariogênicos em bebês cuja dentição decídua ainda não tenha irrompido, uma vez que a presença dessas bactérias não é detectada em bebês edêntulos (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CARLSSON *et al.*, 1975; ALALUUSUA, 1991) que não apresentam superfícies sólidas requeridas para sua adesão (CATALANOTTO *et al.*, 1975; STILES *et al.*, 1976).

Uma pergunta então foi formulada nos meios acadêmicos: A aquisição inicial de estreptococos grupo mutans ocorre logo após a emergência dos incisivos centrais? Essa questão foi parcialmente solucionada por CAUFIELD *et al.* (1991) e por CAUFIELD *et al.* (1993) que detectaram a presença dessas bactérias em 25% de 38 crianças aos 19 meses de idade e em 75% aos 31 meses de idade, sendo que a idade média quando da aquisição foi de 26 meses (FIG. 1). Esse período passou a ser denominado como “janela de infectividade”, e iniciava-se cerca de 12 meses após a emergência dos primeiros dentes.



A descoberta dessa janela de infectividade levou a uma melhor compreensão de achados anteriores. Achados de KÖHLER *et al.* (1983) mostram existir uma significativa tendência em se aumentar a proporção de crianças infectadas por *S. mutans* conforme as mesmas vão atravessando a janela de infectividade, e que medidas preventivas devem ser tomadas no sentido de se evitar ou retardar a primoinfecção nessa faixa etária, visto que crianças com histórico precoce de cárie dental tornam-se pacientes de alto risco (KÖHLER *et al.*, 1984, FUJIWARA *et al.*, 1991). MATEE *et al.* (1992) já haviam relatado que crianças amamentadas ao peito durante 1 e 2,5 anos de idade, por conseguinte, com uma íntima relação de proximidade física com suas mães, podem apresentar altas contagens de estreptococos e lactobacilos cariogênicos, além de altos índices de cárie mesmo na ausência de uso de mamadeiras adoçadas com sacarose, durante a fase de desmame.

Alguns estudos anteriores à elaboração da “teoria da janela de infectividade”, mostram que a aquisição inicial de estreptococos cariogênicos pode ocorrer mais

precocemente. BERKOWITZ & JONES (1985) mostraram que crianças com 10-16 meses de idade possuíam um único mutacinotipo, ao passo que suas mães possuíam mais de um tipo ocorrendo simultaneamente, o que sob a óptica da janela de infectividade, mostra que o clone predominante na mãe é aquele mais facilmente transferido para crianças com idades inferiores ao valor base na janela. Outra observação digna de nota, mostra que crianças com 13-22 meses de idades, filhas de mães com altas contagens de *S. mutans* e que fazem uso de mamadeiras adoçadas, tendem a apresentar altas contagens de bactérias cariogênicas e superfícies dentais cariadas (BROWN *et al.*, 1985). Essa constatação mostra que a alta carga infectiva proveniente das mães associada ao hábito da ingestão de uma dieta calórica pode antecipar essa janela de infectividade. Essa característica de precocidade no estabelecimento da infecção em relação à janela de infectividade proposta por CAUFIELD *et al.* (1991), e novamente por CAUFIELD *et al.* (1993) foi analisada por NEWBRUN (1992) que apontou para o fato de que as mães possuem uma população de estreptococos grupo mutans mais heterogênea, inclusive com capacidades infectivas diversas (GRÖNROOS *et al.*, 1998).

Através do *fingerprinting* por ribotipagem, ALALUUSUA *et al.* (1996) mostraram que crianças com “cárie-de-mamadeira” albergavam dois ou mais clones de estreptococos cariogênicos (não foi feita distinção entre *S. mutans* e *S. sobrinus*) assim como suas mães, e que esses clones perduravam por toda a extensão da janela de infectividade, ao passo que crianças livres de cárie apresentavam somente um ribotipo que podia inclusive desaparecer durante os 18-36 primeiros meses de vida. Num estudo paralelo, KREULEN *et al.* (1997) utilizaram a RP-PCR (*random primed polymerase chain reaction*) para analisar isolados de *S. mutans* e demonstrando que crianças que tiveram cárie-de-mamadeira (uso de

mamadeiras até os 30 meses, em média) apresentavam um único tipo clonal da bactéria, ao passo que seus irmãos não afetados apresentaram uma maior diversidade clonal. Esses achados corroboram com a premissa de que cepas instaladas durante a janela de infectividade e que tornaram-se dominantes numéricos, tendem a serem preservados ao longo da infância.

Após a “descoberta” da janela de infectividade para estreptococos grupo mutans, seguiram-se algumas tentativas de se estabelecer janelas de infectividade para outros estreptococos orais (CAUFIELD & DASANAYAKE, 1996) ou mesmo uma segunda janela para estreptococos grupo mutans entre os 6 e os 12 anos de idade, quando a dentição permanente emerge (CAUFIELD *et al.*, 1993; CARLÉN *et al.*, 1996).

Além do aspecto das janelas de infectividade dos estreptococos grupo mutans, outro ponto vem despertando o interesse da classe acadêmica, no tocante a transmissibilidade dessas bactérias cariogênicas: a fidelidade da infecção inicial das crianças a partir de suas mães. LI & CAUFIELD (1995) acompanharam um grupo de pares mãe-filho com coletas periódicas de mutans a cada 3 meses, desde o nascimento até a idade de 3 anos e obtiveram que 24/34 (70,6%) albergavam genótipos de mutans idênticos aos de suas mães, sendo que a maior fidelidade de transmissão ocorreu nos pares mãe-filha (88%), contra 53% nos pares mãe-filho. Esses achados podem levar à inferência de que hábitos sociais podem ser diferentes entre os pares mãe-filha e mãe-filho (CAUFIELD, 1997).

A conservação gênero-específica acessada por EMMANUELSSON & WANG (1998) em famílias chinesas mostra que 100% das meninas analisadas, em contraste com 50% dos meninos, albergavam um genótipo similar a um ou a ambos pais, o que ressalta a estrita aquisição intrafamiliar de bactérias cariogênicas pelas meninas daquela população.

Alguns autores defendem a posição de que uma infecção primária anterior à erupção dental poderia inclusive trazer alguns benefícios à criança numa fase posterior. Esses autores baseiam-se principalmente em achados preliminares onde apesar das altas concentrações de *S. mutans*, os dentes não apresentavam características clínicas de cárie (KÖHLER & BRATTHALL, 1979; KÖHLER *et al.*, 1983). Os resultados de um estudo conduzido por AALTONEN *et al.* (1985) sugerem que crianças cujas mães apresentavam altas contagens de *S. mutans* durante a fase pré-dentada da criança (“período de imunização”) e baixos valores para essas bactérias durante a fase dentada (“período de infecção”), foram significativamente menos propensas à cárie dental que outras expostas a uma baixa imunização e alto desafio infectivo, dessa maneira, a exposição infantil aos antígenos das bactérias cariogênicas maternas numa fase anterior a erupção dos dentes pode aumentar a resistência da criança à infecção por esses patógenos (AALTONEN & TENOVUO, 1994). Porém, esses achados não podem ser creditados à uma pretensa atividade de sIgA anti-*S. mutans*, conforme proposto por CAMLING & KÖHLER (1987), as quais não obtiveram valores discrepantes nas concentrações desse anticorpo em crianças cujas mães foram submetidas a um programa de profilaxia e em crianças cujas mães não receberam tal tratamento na fase pré-dentada da criança.

Muito embora já tenhamos apontado a importância dos estreptococos grupo mutans como agente etiológico da cárie dental, a sua simples presença na cavidade oral não pode ser relacionada à doença. SULLIVAN *et al.* (1989, 1996) defendem a tese de que variações nas contagens de estreptococos e lactobacilos cariogênicos não necessariamente refletem a condição de saúde dental dos pacientes e que a simples quantificação dessas bactérias não é um recurso inteiramente seguro para a predição de cáries.

O acesso ao flúor também deve ser tomado em conta, uma vez visto que indivíduos vivendo em áreas cujas águas de consumo são fluoretadas, apresentam uma menor incidência de cáries quando comparado com outros residentes em áreas onde esse benefício não é disponível (GROENEVELD & BACKER-DIRKS, 1988). O papel do flúor como redutor de cáries foi avaliado por TWETMAN *et al.* (1990) que obtiveram 52% de crianças livres de cárie numa região com alta concentração de flúor na água de consumo a despeito dos altos números de estreptococos cariogênicos em suas salivas.

Uma dieta rica em açúcares fermentáveis, em especial a sacarose, leva a uma queda nos valores de pH na placa dental, bem como a um aumento na proporção de estreptococos cariogênicos nessa placa. Essa constatação levou HAYES *et al.* (1983) a comparar os hábitos dietéticos de crianças com 3-9 anos livres de cárie (CPOD = 0), crianças susceptíveis sem histórico de novas lesões e restaurações por 3 anos, e crianças com atividade de cárie. Nesse estudo, os pesquisadores também incluíram os mesmos três grupos para estudantes de 18-23 anos. Obtiveram que as crianças e os jovens dos dois primeiros grupos não tinham o hábito de ingerirem sacarose entre as refeições e apresentavam uma microbiota menos cariogênica que a dos terceiros grupos.

No tocante a microbiota cariogênica de adolescentes livres de cárie, num estudo de 1990 conduzido por NYVAD & KILIAN, foi demonstrado que 4 horas após a introdução de uma superfície de esmalte isenta de estreptococos na cavidade oral, ocorriam significantes variações na composição da microbiota estreptocócica inicial, quando comparada com a de outros adolescentes cárie-ativos. Dentre esses achados para o grupo livre de cárie, salientam-se uma menor quantidade de *S. mutans* aderido ao esmalte e uma maior proporção de *S. sanguis* e estreptococos produtores de IgA1-protease.

A utilização de proteínas da saliva como fonte de nitrogênio por parte de *S. mutans* de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos foi avaliada por COWAN *et al.* (1979). Nesse estudo, obtiveram que sobrenadantes estéreis de saliva total estimulada obtida a partir de pacientes cárie-ativos consistentemente suportava melhor o crescimento de *S. mutans* quando comparada com as secreções de indivíduos livres de cárie. Obtiveram ainda que inibidores de crescimento para essa bactéria não foram aparentes quando salivas de livres de cárie eram adicionadas a um meio de cultura a base de aminoácidos. Em 1983, esse mesmo grupo de pesquisadores (COWAN *et al.*, 1983) comparou o crescimento de uma cultura de *S. mutans* (VA-29R) em substratos líquidos cujas fontes de nitrogênio eram as proteínas das salivas de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos. Nas culturas com saliva proveniente de pacientes do segundo grupo (cárie-ativos) observou-se um crescimento significativamente maior ($p = 0,05$) de *S. mutans*, o que veio a confirmar os resultados do trabalho anteriormente publicado por esses autores.

3 PROPOSIÇÃO

Com base na observação de que a literatura especializada contempla poucos estudos acerca da variabilidade genética de estreptococos cariogênicos em indivíduos “livres de cáries”, a proposição primeira deste trabalho de pesquisa é analisar o perfil de colonização dos *Streptococcus mutans* presentes na cavidade de indivíduos livres de cárie envolvendo a detecção do polimorfismo genético destes microrganismos através da técnica de eletroforese de isoenzimas (MLEE).

A plena compreensão da estruturação populacional dessas bactérias num grupo humano com características tão particulares, muito provavelmente, contribuirá de forma positiva no melhor entendimento da doença cárie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos voluntários

Foram selecionados 8 voluntários, alunos do curso de graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, de ambos os sexos, com idade variando entre 17 e 21 anos, que não estavam fazendo uso de medicação antibiótica ou imunossupressora nos últimos seis meses, e que apresentavam índice CPOD igual a zero (WALTER & SHKLAIR, 1982), no momento das coletas.

4.2 Isolamento e confirmação da identidade das linhagens de *S. mutans*

Aos voluntários, foi solicitado que dispensassem saliva não estimulada em tubos de rosca estéreis, até quantidade aproximada de 1mL, sendo que essas coletas foram realizadas entre 8 e 9 horas da manhã. Com o auxílio de uma cureta, foi realizada raspagem das faces vestibulares e linguais dos dentes, para obtenção de uma amostra significativa da microbiota da placa dental. O material originário do dorso da língua foi coletado através de raspagem com o auxílio de “swab” estéril.

As amostras de placa dental e dorso de língua foram acrescidas de solução salina 0,9% e, assim como as amostras de saliva, foram submetidas a 30 segundos de vibração em um agitador de tubos (Phoenix – AT 56), visando a obtenção de uma suspensão uniforme. Em seguida, as mesmas foram diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-3} em solução salina a 0,9%.

Para o cultivo de *S. mutans*, alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram inoculadas em duplicata em placas de Petri, contendo Mitis Salivarius Bacitracina Ágar (MSB), em anexo. Após incubação a 37°C por 24-48 horas em atmosfera com pCO₂ de 10% (Cole-Parmer®), foram tomadas entre 10 a 20 colônias de *Streptococcus* grupo mutans crescidas

em diferentes pontos da superfície do meio de cultura, de forma aleatória, que foram transferidas, cada uma, para tubo de cultura contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), em anexo, e mantidos em condições ótimas de desenvolvimento celular (37°C, pCO₂ 10%, 24-48 horas). Aliquotas de 1mL das amostras foram armazenados a -18°C em BHI-glicerol a 10% (ANEXO) para manutenção das mesmas.

A identificação das cepas de *Streptococcus* do grupo mutans foi realizada através de provas bioquímicas, seguindo-se os critérios adotados no Manual de Bergey's (HARDIE, 1986), utilizando-se as provas de fermentação de manitol, sorbitol, melibiose e rafinose, hidrólise de arginina, produção de peróxido de hidrogênio e sensibilidade à bacitracina. As inoculações foram realizadas sempre a partir de culturas recentes (24 horas) em BHI.

Para a identificação, foi seguida a tabela das características bioquímicas para a identificação da espécie de *Streptococcus* do grupo mutans, de acordo com HARDIE (1986) (TAB. 1).

Tabela 1: Critérios para determinação bioquímica das espécies de estreptococos grupo mutans

Provas	S. mutans		S. rattus	S. cricetus	S. sobrinus	S. ferus	S. macacae	S. downei
	c-e-f	e	b	a	d-g	c	c	h
Fermentação de:								
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	-	+	+	-**	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-**	-	+	-
Produção de H ₂ O ₂	-	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólise da Arginina	-	-	+	-	-	-	-	-
Resistência à Bacitracina	+	+	+	-	+	-	-	-

(*) algumas cepas podem dar resultado negativo; (**) algumas cepas podem dar resultado positivo.

4.2.1 Fermentação de Carboidratos

Nesta prova bioquímica foi utilizado o meio base constituído por caldo de tioglicolato sem dextrose ou outro açúcar, 1,5% de ágar e 0,0016% de púrpura de bromocresol. Após dissolução dos componentes em água destilada, o pH foi acertado para 7,0 e os substratos manitol, sorbitol e melibiose foram adicionados na proporção final de 1,0%, respectivamente, e o meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Para a rafinose, o meio base foi previamente autoclavado e a solução do açúcar esterilizada por filtração, utilizando-se membranas filtrantes com poros de 0,22µm (Millipore), na proporção final de 1,0%. Os meios contendo os diferentes açúcares foram distribuídos em placas de Petri em alíquotas de 20 mL.

Por meio de um repicador de *Steer*, foram inoculados 5µL das culturas de 24 horas nas placas contendo os diferentes carboidratos, e estas foram incubadas nas mesmas condições anteriores. A primeira leitura foi realizada após 24 horas. A prova é considerada positiva quando houver viragem do indicador de pH, da cor púrpura para a amarela (ANEXO).

4.2.2 Produção de Peróxido de Hidrogênio

A prova de produção de peróxido de hidrogênio foi realizada segundo WHITTENBURY (1964). O pH do meio base foi ajustado a 7,2, sendo esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. À seguir, o meio foi resfriado até atingir uma temperatura próxima a 45°C, e foram adicionados 5,0mL de uma mistura de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada estéril, em partes iguais, e ainda uma solução de

0,1g de orto-dianisidina em 5,0mL de água destilada estéril, sendo o meio total aquecido em banho-maria fervente por 15 minutos, e distribuído ainda quente em Placas de Petri.

A semeadura a partir das culturas das cepas em BHI, consistiu de 3 inoculações próximas, tipo “pícada”, feitas com agulha de platina diretamente no meio de cultura. As placas foram incubadas em pCO₂ 10%, por um período de até 7 dias a 37⁰C. A produção de peróxido de hidrogênio é detectada pelo aparecimento de um halo marrom-escuro ou preto em torno do crescimento (ANEXO).

4.2.3 Resistência à Bacitracina

Ao meio base utilizado no teste de fermentação de manitol (SHKLAIR & KEENE, 1974), acrescido de duas unidades internacionais de bacitracina por mililitro, foi adicionado 1,0g de manitol para cada 100mL do meio, que foi autoclavado. Após resfriamento até cerca de 45⁰C, foi adicionada a bacitracina (0,0037%) esterilizada por filtração, e o meio foi distribuído em alíquotas de 20mL em placas de Petri.

Após a semeadura, as amostras foram incubadas em pCO₂ 10% por até 72 horas a 37⁰C. O crescimento do microrganismo indica sua resistência ao antibiótico presente no meio, observada com a mudança da cor púrpura para amarela, indicando a fermentação do manitol (ANEXO).

4.2.4 Hidrólise da Arginina

Esta prova se baseia na produção ou não da enzima arginina-desaminase, a qual libera amônia ao agir sobre o substrato arginina. A capacidade das cepas de hidrolisarem arginina produzindo amônia, foi testada como preconizado por NIVEN *et al.* (1942) e preparado segundo AZEVEDO (1988).

O meio de cultura utilizado nesta prova bioquímica é composto por: 0,5% extrato

de levedura, 0,5% triptona, 0,2% fosfato dipotássio, 0,05% glicose, 0,3% D-arginina HCl, sendo o volume final obtido pelo acréscimo de água destilada. As cepas foram semeadas transferindo-se 0,1mL do inóculo para os tubos contendo o meio de cultura, e estes foram incubados a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionadas duas gotas do reativo de Nessler a cada tubo. A presença de amônia na cultura, evidenciada pelo aparecimento de coloração alaranjada, indica reação positiva enquanto que a coloração amarela indica prova negativa (ANEXO).

4.3 Eletroforese de isoenzimas (Multilocus Enzyme Electrophoresis-MLEE)

As linhagens que confirmadamente (provas bioquímicas) são *S. mutans* e sua linhagem-tipo (ATCC25175) foram cultivadas a 37°C, pCO₂ 10%, por 24 horas, em frascos com 400mL de caldo de infusão de cérebro e coração (B.H.I.).

Após 24 horas de incubação, as culturas foram centrifugadas a 2000g e os sedimentos foram lavados duas vezes com tampão fosfato de potássio 40mM (pH 7,5), transferidos para tubos de 2mL com tampa de rosca e os precipitados finais ressuspensos em aproximadamente 250mL desse mesmo tampão, aos quais foram adicionados pérolas de vidro (0,45-0,55mm Ø) previamente tratadas com ácido clorídrico 1:1 (FIG. 2), em quantidades iguais a de massa celular (\approx 500mg). Os tubos foram adaptados em um disruptor de células Bead Beater (Biospec, Inc.) (FIG. 3), onde foram agitados a 4500rpm por 1 minuto, em 2 tomadas de 30 segundos com intervalo de 5 minutos quando os tubos foram mantidos em gelo. Uma centrifugação a 5000g forneceu os sobrenadantes com as proteínas citoplasmáticas totais (FIG. 4 e 5) que foram aplicados em tiras de papel de filtro

(“wicks”) Whatman nº 3 de 5x12mm, que foram mantidas a -75°C , até momento de uso (FIG. 6).



Figura 2 - Tubo plástico com rosca (2mL) empregado na extração de proteínas de *Streptococcus mutans*. Tampão Fosfato ($\cong 250\mu\text{L}$); pérola de vidro ($\cong 500\text{mg}$); massa celular ($\cong 500\text{mg}$).

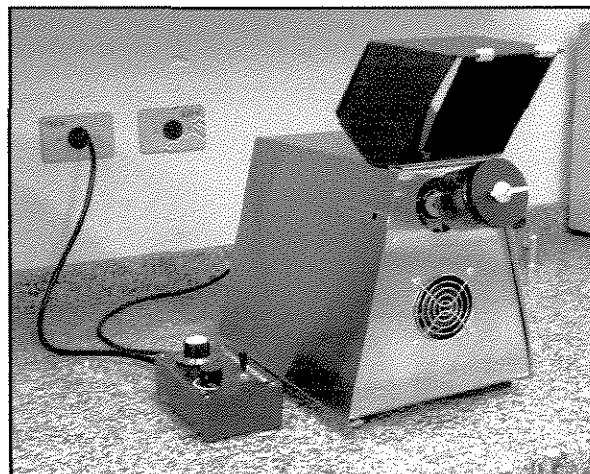


Figura 3 - Disruptor de células BeadBeater® (Biospec Products, Inc.).

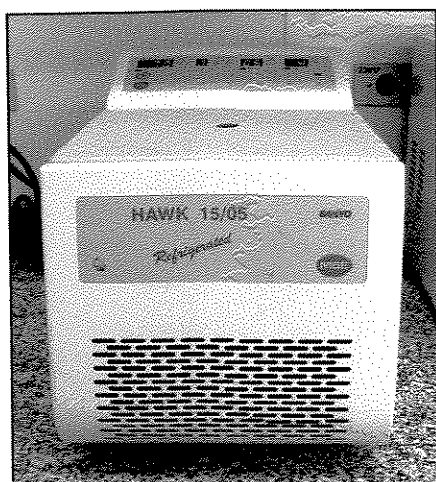


Figura 4 - Centrífuga Refrigerada HAWK 15/05 Mod.MSB005.CR2.H (SANYO Gallenkamp PLC).

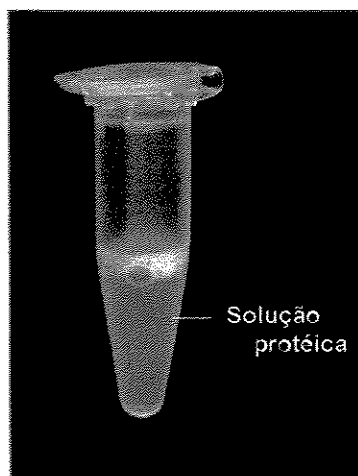


Figura 5 - Solução protéica ($\cong 250\mu\text{L}$) armazenada em tubos Eppendorf (1,5mL) a -70°C .

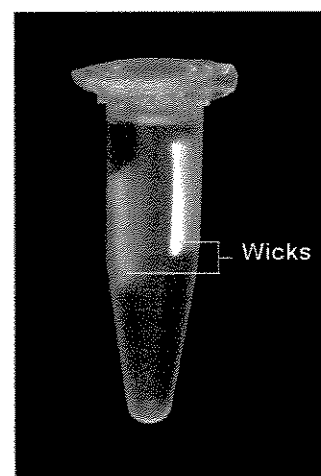


Figura 6 - Wicks embebidos em solução protéica ($\cong 25\mu\text{L}$) e armazenada em Eppendorf (1,5mL) a -70°C .

A eletroforese foi processada em suporte de amido (SMITHIES, 1955) de milho (VAL *et al.*, 1981) hidrolizado (Penetrose 30, das Refinações de Milho Brasil Ltda). O amido foi dissolvido até concentração final de 13%, sob aquecimento em forno de microondas e agitação, em solução tampão do gel (ANEXO), específica para as enzimas analisadas, de acordo com SELANDER *et al.* (1986) e GILMOUR *et al.* (1987) (FIG. 7A, 7B e 7C). Depois de completamente dissolvido o amido, a mistura foi vertida em molde de acrílico de 200x120x10mm (ALFENAS *et al.*, 1991) (FIG. 8A e 8B), onde permaneceu até resfriamento, quando então, foi feito um corte longitudinal a 25mm de uma das margens, na sua maior extensão. A menor porção fatiada do gel foi afastada e na fenda formada foram inseridos os “wicks” com as amostras (FIG. 9). As duas partes do gel foram novamente unidas e todo o conjunto foi levado ao refrigerador.

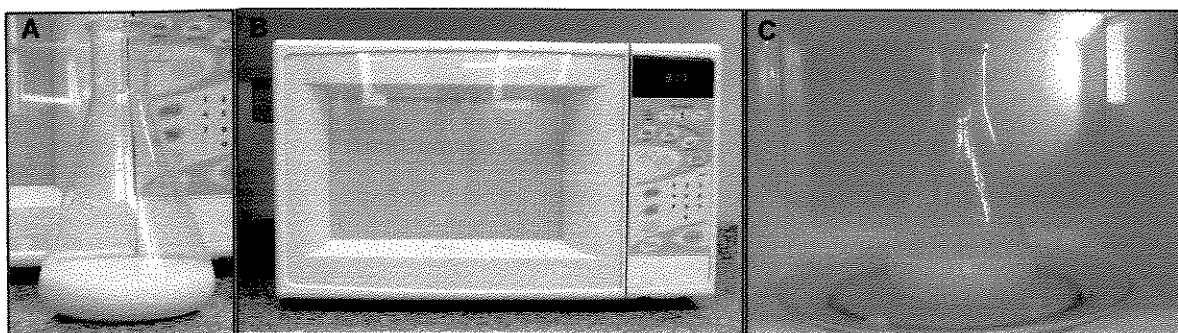


Figura 7 - A. Frasco de Erlenmeyer (1000 mL) contendo Penetrose 30[®] a 13% em tampão 1:30 Tris-citrato (TC) pH 8,0; **B.** Forno Microondas M-34 (CCE Eletrodomésticos S/A); **C.** Gel de amido após o cozimento.

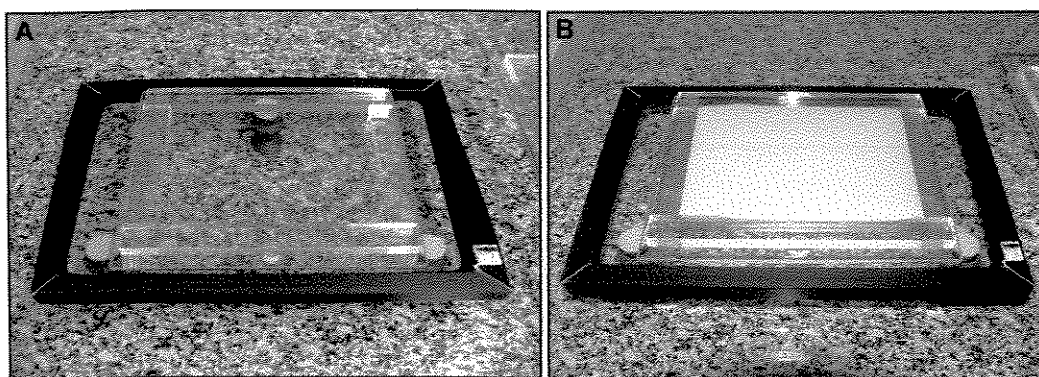


Figura 8 - A. Molde de acrílico (200x120x10mm) sobre uma base de vidro regulável; B. Gel de amido em molde de acrílico.

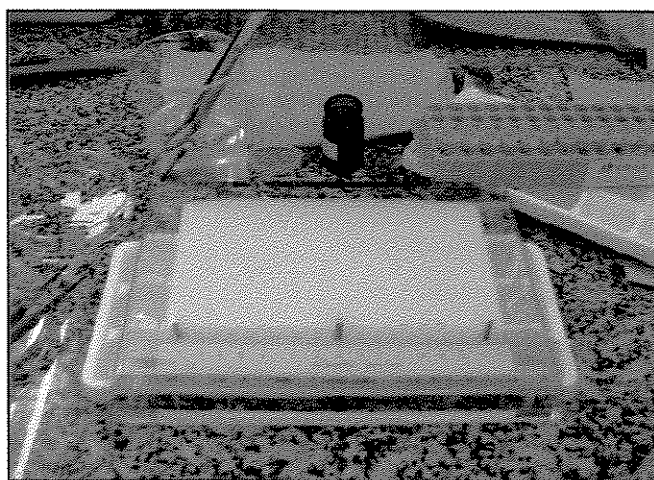


Figura 9 - Aplicação da amostra e azul de bromofenol em gel de amido.

Os moldes foram colocados sobre as cubas contendo o sistema de tampões adequado para a enzima estudada (SELANDER *et al.*, 1986) que foram conectadas ao gel através de pontes de tecido (Perfex®) embebidas de tampão.

A partir de uma fonte de eletroforese, foi aplicada uma d.d.p. de 130 volts, por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a fonte foi desligada e os “wicks” retirados. As faces internas da fenda foram limpas com cotonete de algodão hidrófilo. Os géis foram novamente reunidos e o procedimento eletroforético foi reiniciado, *over-night*, até que o

indicador de migração deslocasse aproximadamente 80-100mm a partir da linha de aplicação, o que pode ser observado, devido a colocação de 2 “wicks” embebidos com solução de azul de bromofenol, em cada uma das duas extremidades da fenda (FIG. 10).



Figura 10 - Sistema de corrida eletroforética para isoenzimas (gel de amido apoiado sobre as cubas e conectado através de ponte de tecidos).

Ao término da corrida eletroforética, a fonte foi desligada, o gel foi retirado e fatiado na sua altura, em lâminas de aproximadamente 1,5mm de espessura por intermédio de réguas sobrepostas e de um fio de diâmetro mínimo (linha para pesca nº 15) (FIG. 11). Essas fatias foram removidas para cubas de porcelana de fundo branco e nelas foram feitas as revelações das enzimas (FIG 12).

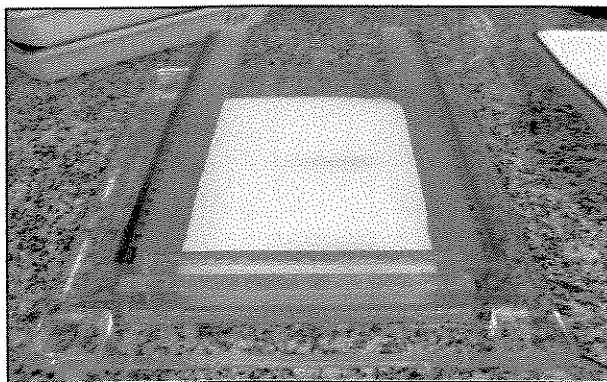


Figura 11 - Sistema para laminação do gel de amido. Mesa de acrílico, réguas (1,5mm de espessura) e fio para pesca nº 15.

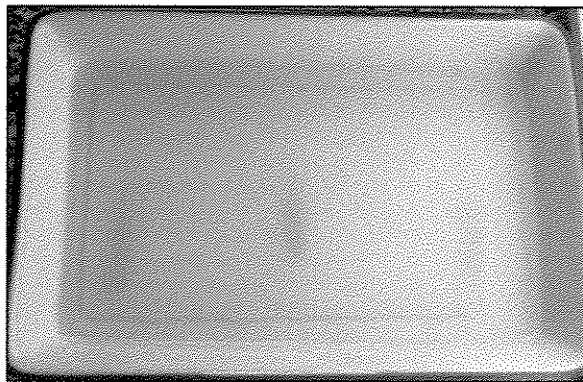


Figura 12 - Gel de amido em lâmina pronta para coloração.

Os sistemas enzimáticos analisados foram (SELANDER *et al.*, 1986; GILMOUR *et al.*, 1987; ALFENAS *et al.*, 1991): álcool desidrogenase (ADH), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), aspartato desidrogenase (ASD), glucose desidrogenase (GDH), manitol desidrogenase (MADH), sorbitol desidrogenase (SDH), aconitase (ACO), enzima málica (ME), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), transaminase glutâmico-oxalacética (GOT), α -esterase (EST), β -esterase (EST), leucina aminopeptidase (LAP), glicosil transferase (GTF), peroxidase (PO), α -amilase (α -AM), manitol 1-fosfato desidrogenase (M1P).

4.4 Análise dos padrões eletroforéticos

As imagens positivas dos géis da MLEE, foram capturadas por um “scanner” Hewlett®-Packard modelo ScanJet 4C/T e transferidas para a interface de análise de géis do programa SigmaGel™ for Windows™ (Jandel Scientific), onde foram feitas as determinações dos valores de mobilidade relativa (Rm) para cada banda eletroforética, em função da distância de migração distal do azul de bromofenol (na MLEE).

A análise comparativa dos perfis da MLEE dos isolados de cada voluntário, acessada pela soma de todos sistemas enzimáticos, permitiu observar a ocorrência ou não de um ou mais clones de *S. mutans* na saliva, biofilme bacteriano e dorso da língua desses voluntários com índices CPOD iguais a zero. Os isolados que apresentaram mesmo tipo eletromórfico (ET) foram considerados com sendo um mesmo clone bacteriano.

Com a finalidade de confirmação matemática, os perfis de todos os isolados (em seus valores Rm) foram convertidos em matriz de dados binários, na qual a presença de uma banda num dado Rm recebeu valor 1 e a ausência recebeu valor 0. Essa matriz foi

plotada no programa NTSYS versão 1,7 (Applied Biostatistics, Inc.) que forneceu, mediante a aplicação do coeficiente de associação Simple Matching (SNEATH & SOKAL, 1973), uma matriz de similaridade que após tratamento com o algoritmo UPGMA forneceu um dendrograma de similaridade, com o agrupamento dos possíveis clones formados.

5 RESULTADOS

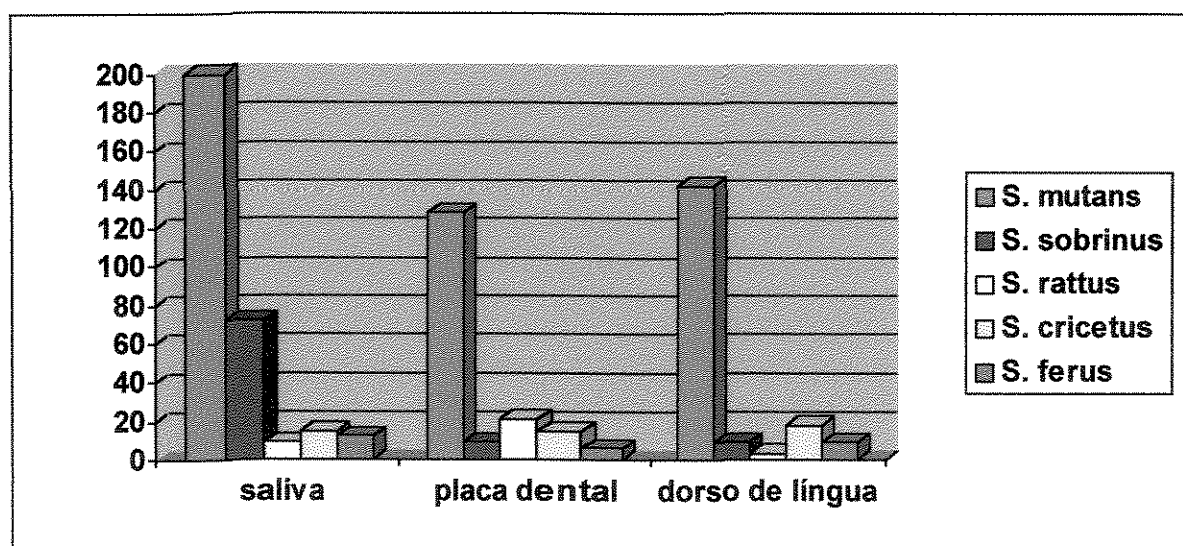
5.1 Identificação das espécies de estreptococos cariogênicos

Os resultados obtidos nos testes de identificação de *Streptococcus* do grupo mutans, a partir das amostras de saliva, placa dental e dorso de língua de voluntários que não apresentam cáries e/ou restaurações referentes a cáries anteriores, permitiram a classificação em espécies diversas, conforme pode ser observado na TAB. 2 e GRAF 1.

Tabela 2: Distribuição e freqüência de amostras de *Streptococcus* do grupo mutans isoladas de diferentes nichos da cavidade oral de voluntários livres de cárie

Nichos da cavidade oral					
Espécies isoladas	Saliva	Placa dental	Dorso de língua	Total	%
<i>Streptococcus mutans</i>	200	128	142	470	70,36
<i>Streptococcus sobrinus</i>	72	9	9	90	13,47
<i>Streptococcus cricetus</i>	15	15	18	48	7,19
<i>Streptococcus rattus</i>	9	21	3	33	4,94
<i>Streptococcus ferus</i>	12	6	9	27	4,04
Total	308	179	181	668	100

Gráfico 1: Distribuição e freqüência de *Streptococcus* do grupo mutans de voluntários livres de cárie nos nichos pesquisados



Dentre as 668 amostras de *Streptococcus* do grupo mutans obtidas, a maioria dos microrganismos encontrados na cavidade oral de voluntários livres de cárie foram identificadas como sendo da espécie *Streptococcus mutans* (70,36%) seguido de *S. sobrinus* (13,47%), *S. cricetus* (7,19%), *S. rattus* (4,94%) e *S. ferus* (4,04%). De acordo com a TAB. 2 e o GRAF 1, as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* foram predominantes na saliva com 200 e 72 amostras, respectivamente, enquanto que na placa dental, a predominância foi de *S. mutans* seguida de *S. rattus* (128 e 21, respectivamente) e no dorso de língua, a predominância foi de *S. mutans* e *S. cricetus* (142 e 18, respectivamente).

Dos isolados identificados, por provas bioquímicas, como sendo *S. mutans* foram tomados um total de 201 cepas que foram armazenados a -70°C para as etapas posteriores do projeto.

5.2 Eletroforese de isoenzimas

Paralelamente às etapas de identificação dos isolados, procedeu-se a padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas, empregando-se os extratos celulares de *Streptococcus mutans* (linhagem ATCC-25175 e três isolados clínicos), *Staphylococcus aureus* (linhagem LM-003) e *Candida albicans* (linhagem CBS-562).

Dentre todas as enzimas ensaiadas durante o processo de padronização, observou-se que a maioria das desidrogenases [álcool desidrogenase (ADH), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), aspartato desidrogenase (ASD), glucose desidrogenase (GDH), manitol desidrogenase (MADH), sorbitol desidrogenase (SDH), aconitase (ACO), enzima málica (ME)], superóxido dismutase (SOD), α -esterase (EST), β -esterase (EST), peroxidase (PO), α -amilase (α -AM)

e catalase (CAT) não forneceram perfis eletroforéticos detectáveis para *S. mutans*, mesmo em extratos obtidos a partir de diferentes subcultivos. Todas as enzimas acima citadas foram separadas em tampão A, de acordo com os protocolos propostos por SELANDER *et al.* (1986).

Como não foram obtidos perfis eletroforéticos para a maioria das enzimas pesquisadas optou-se por acrescentar mais dois tampões da cuba e do gel, C e D, na intenção de se obter um possível maior número de enzimas expressas. Contudo, mesmo com a inclusão desses dois novos sistemas de tampões, continuou-se não obtendo bandas eletroforéticas para as enzimas acima assinaladas. Foi descartada a possibilidade de que os reagentes pudessem estar comprometidos, uma vez que, embora não se tenha obtido bandas para *S. mutans*, foram normalmente detectadas bandas eletroforéticas para *S. aureus* e *C. albicans*. Possivelmente, essas enzimas sejam produzidas em quantidades inferiores àquelas detectáveis pela técnica, ou mesmo não sejam produzidas pelo *S. mutans*.

No caso específico da glicosil-transferase (GTF), era esperada a ocorrência de bandas eletroforéticas, visto que essa enzima é sabidamente produzida por *S. mutans*. Contudo, mesmo alterando-se as diferentes possibilidades de tampões da cuba e do gel, bem como diversos protocolos de detecção, não foi possível detectar-se a ocorrência de bandas eletroforéticas. Resultado similar foi observado para os outros microrganismos-controle empregados paralelamente.

Os sistemas enzimáticos manitol 1-fosfato desidrogenase (M1P) e leucina aminopeptidase (LAP) em tampão A, e transaminase glutâmico-oxalacética (GOT) em tampão D, forneceram perfis eletroforéticos detectáveis e com capacidade discriminatória infra-específica.

Para que a análise dos tipos genéticos fosse a mais fidedigna possível, optou-se por elevar-se o número de marcadores isoenzimáticos, com a inclusão de três novos sistemas enzimáticos: manose fosfato isomerase (MPI), nucleosíio fosforilase (NSP) e fenilalanil leucina peptidase (PLP). Para a detecção do polimorfismo das amostras, em relação a essas três enzimas empregou-se os seguintes sistemas-tampão, de acordo com SELANDER *et al.* (1986): tampão A [Tris-citrato pH 8 (cuba) e Tris-citrato pH 8 1:30 (gel)], tampão B [Tris-citrato pH 6,3 (cuba) e Tris-citrato pH 6,7 (gel)], tampão C [Borato pH 8,2 (cuba) e Tris-citrato pH 8,7 (gel)] e tampão D [Hidróxido de lítio pH 8,1 (cuba) e Hidróxido de lítio (1:9)-Tris-citrato pH 8,3 (gel)]. As três enzimas foram bem resolvidas no sistema de tampões A, que passou então a ser empregado na análise dos isolados.

Nos testes-piloto conduzidos, os sistemas enzimáticos NSP, PLP e MPI forneceram resultados satisfatórios, permitindo assim como no caso da M1P, LAP e GOT a plena distinção de cepas não relacionadas provenientes de fontes diversas. A inclusão desses novos três sistemas enzimáticos elevou a capacidade do teste em segregar os diferentes tipos genéticos da bactéria, a despeito do tempo gasto na padronização das condições de detecção.

As FIG. 13 a 20 representam os diferentes eletroforegramas derivados da detecção das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, M1P e GOT, para o *Streptococcus mutans* dos diferentes voluntários, nos diferentes sítios (dorso de língua, placa dental e saliva). A expressão das bandas nos diferentes sistemas enzimáticos seguiu um padrão de evidenciamento de múltiplos *loci*, codificando formas alternativas das enzimas, como pode ser observado nos eletroforegramas. Em alguns casos, como, por exemplo, na LAP do voluntário A (FIG. 13), observou-se a existência de um único *locus* codificando a enzima.

Na mesma figura, pode-se observar a expressão alternativa de dois diferentes *loci* codificando uma única cópia da enzima, como no caso da NSP. Duas variantes enzimáticas codificadas por *loci* independentes podem ser observadas ocorrendo na expressão da GOT dos estreptococos cariogênicos do voluntário G (FIG. 17). Em algumas ocasiões, pode-se mesmo detectar a pluri-expressão de 3 diferentes formas da transaminase ocorrendo simultaneamente nas bactérias (FIG. 18). A expressão nula de alguns *loci*, isto é, o não aparecimento de bandas perceptíveis, pode ser evidenciado no bandejamento da LAP das bactérias do voluntário E (FIG. 16).

De acordo com os diferentes perfis de bandejamento enzimáticos acessados nas diferentes figuras, pode-se inferir que um mesmo voluntário estava, no momento das amostragens, colonizado por mais de um tipo clonal de *S. mutans*. Com a finalidade de se comprovar tal achado, foram gerados os dendrogramas baseados nas médias aritméticas não-ponderadas de similaridade-UPGMA (FIG. 21 a 28).

Figura 13: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, MIP e GOT para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário A

Dorso de língua										Placa dental										Saliva										rf
AD8	AD13	AD33	AD34	AD35	AD36	AD37	AD38	AD39	AD40	AP1	AP4	AP6	AP9	AP31	AP32	AP34	AP35	AP36	AP37	AS2	AS3	AS4	AS33	AS35	AS36	AS37	AS38	AS39	AS43	
manose fosfato isomerase (MPI)																														
																														0.64
																														0.48
nucleosídio fosforilase (NSP)																														
																														0.83
																														0.77
fenilalanil leucina peptidase (PLP)																														
																														0.64
																														0.59
leucina aminopeptidase (LAP)																														
																														0.83
manitol 1-fosfato desidrogenase (MIP)																														
																														0.61
																														0.53
glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)																														
																														0.60
																														0.46

AD = Cepas de dorso de língua do voluntário A; AP = Cepas de placa dental do voluntário A; AS = Cepas de saliva do voluntário A

Figura 14: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, MIP e GOT para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário C

Dorso de língua					Placa dental		Saliva						rf
CD31	CD32	CD33	CD34	CD35	CP14		CS2	CS15	CS33	CS35	CS37	CS38	
manose fosfato isomerase (MPI)													
													0.96
													0.85
													0.59
nucleosídio fosforilase (NSP)													
													0.79
fenilalanil leucina peptidase (PLP)													
													0.89
													0.74
													0.57
leucina aminopeptidase (LAP)													
													0.78
													0.74
manitol 1-fosfato desidrogenase (MIP)													
													0.84
													0.63
glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)													
													0.85
													0.56
													0.44

CD = Cepas de dorso de língua do voluntário C; CP = Cepas de placa dental do voluntário C; CS = Cepas de saliva do voluntário C

Figura 15: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, MIP e GOT para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário D

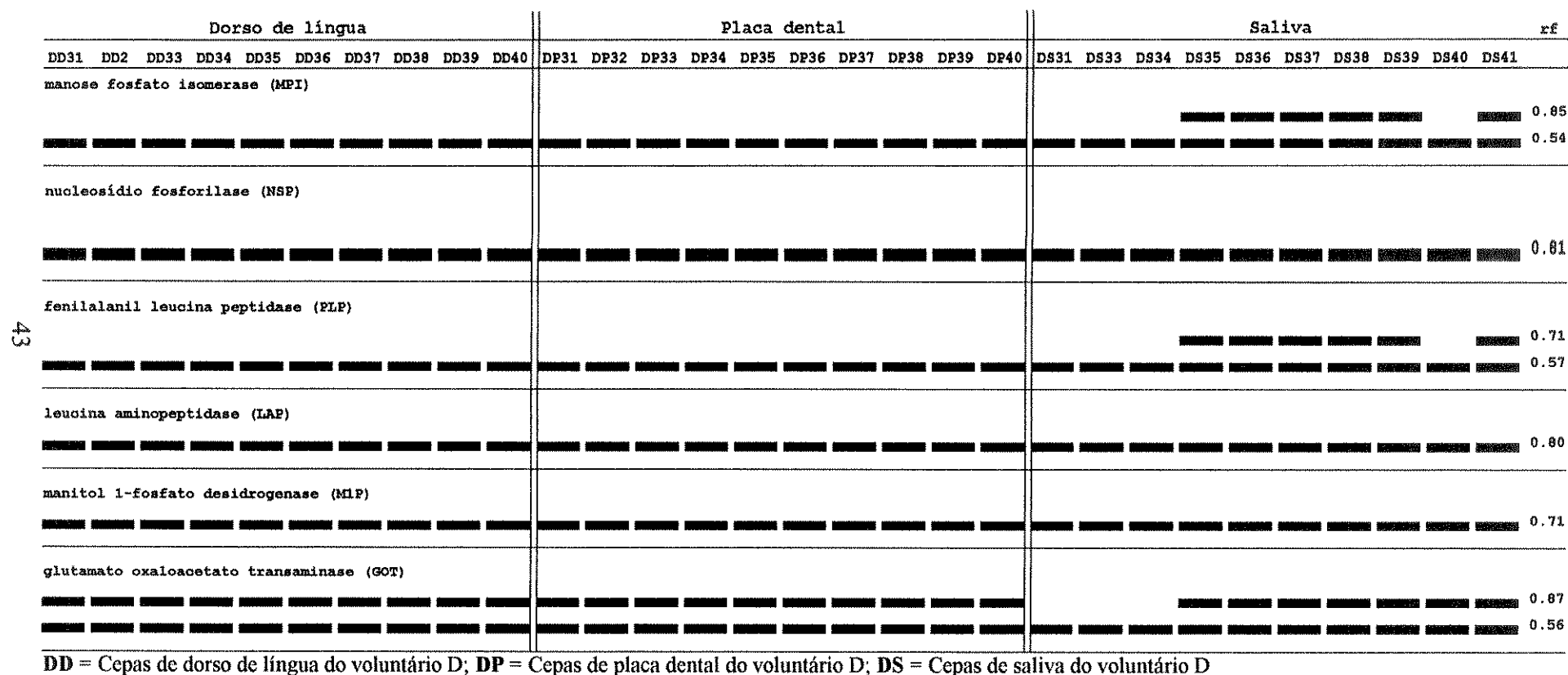
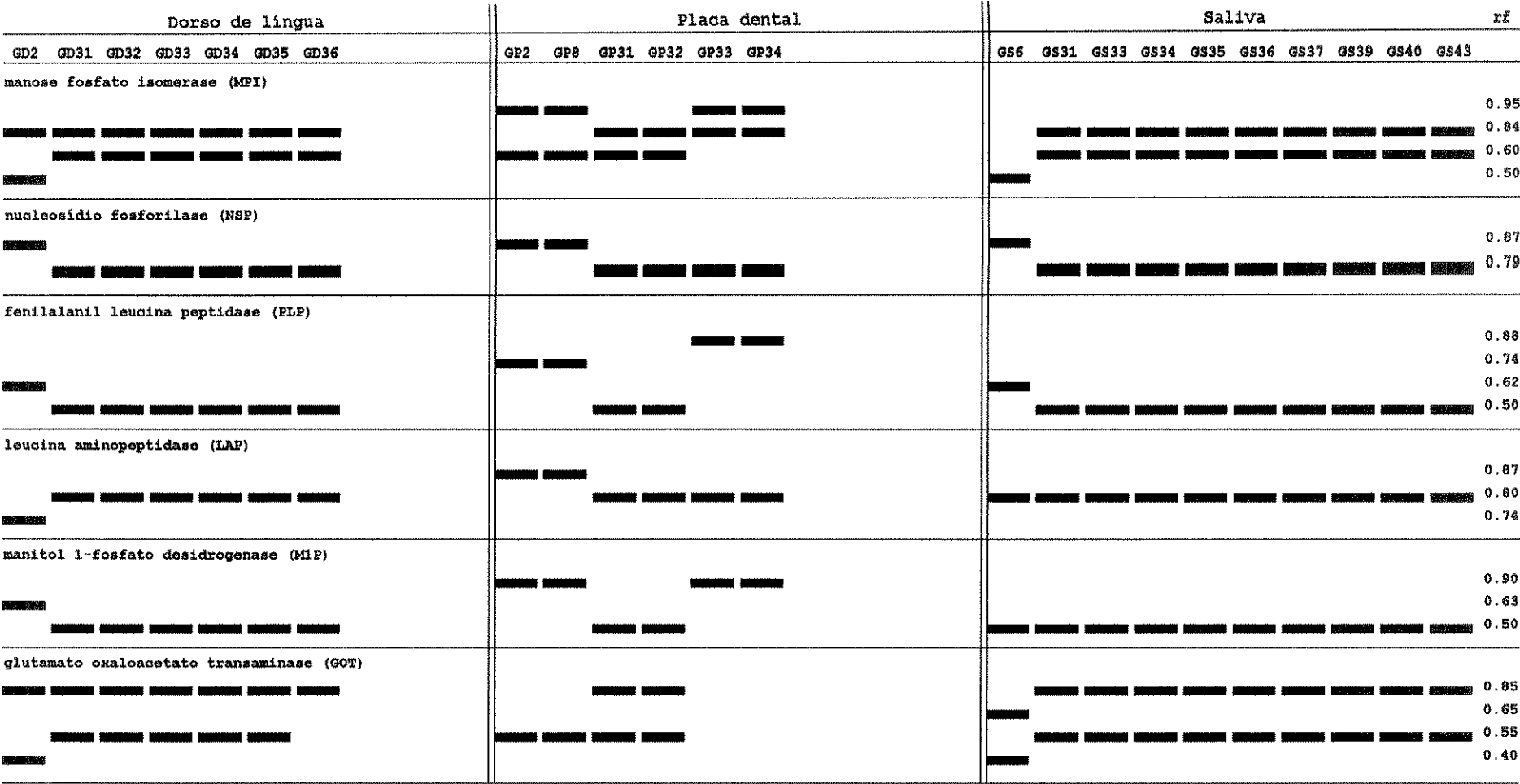


Figura 17: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, MIP e GOT para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário G



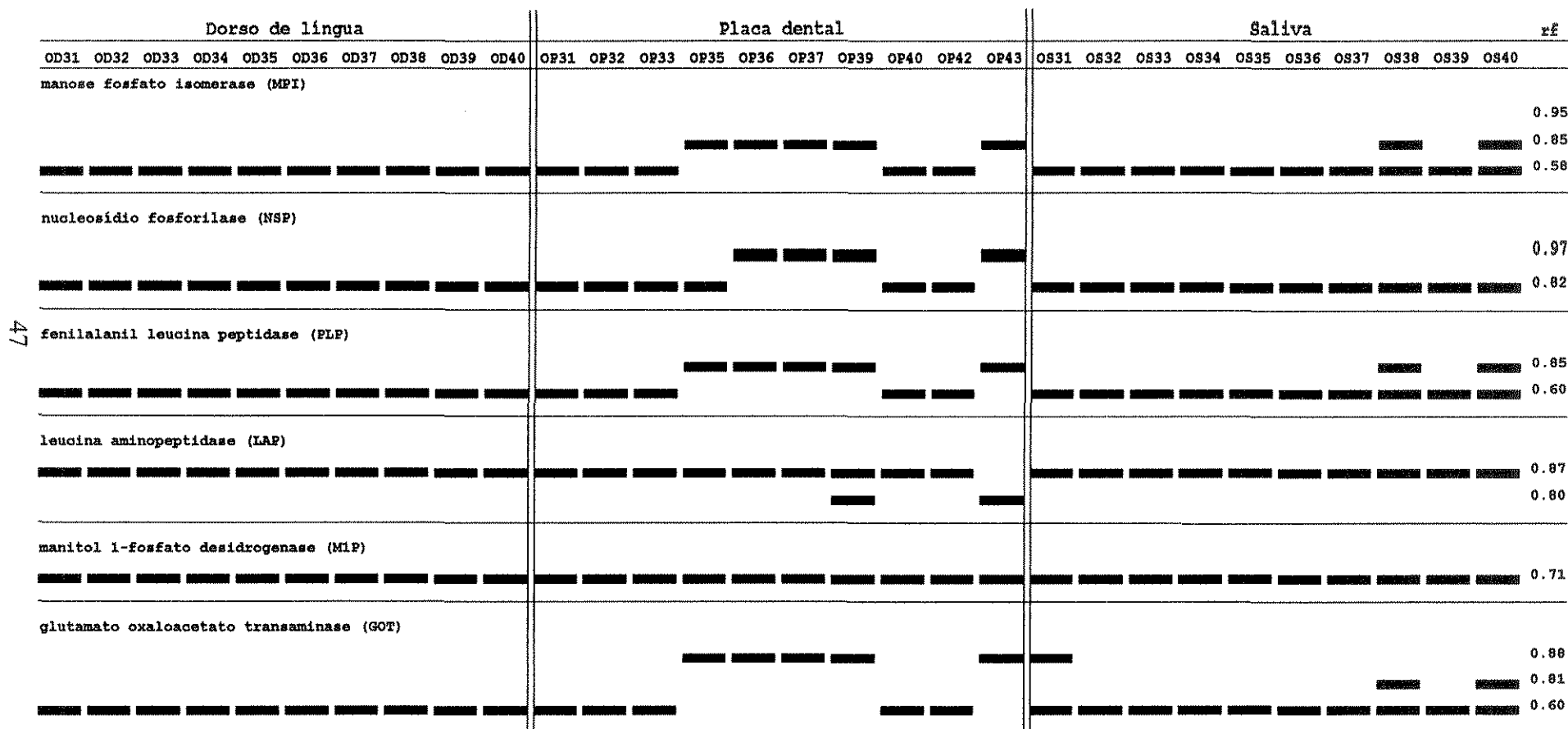
GD = Cepas de dorso de língua do voluntário G; GP = Cepas de placa dental do voluntário G; GS = Cepas de saliva do voluntário G

Figura 18: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, MIP e GOT para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário I

Dorso de língua										Placa dental										Saliva										rf
ID31	ID32	ID33	ID35	ID36	ID37	ID38	ID39	ID41	ID42	IP1	IP5	IP8	IP31	IP32	IP33	IP34	IP35	IP36	IP37	IS1	IS3	IS34	IS35	IS36	IS37	IS38	IS39	IS40	IS41	
manose fosfato isomerase (MPI)																														0.85
																														0.50
nucleosídio fosforilase (NSP)																														0.87
																														0.79
fenilalanil leucina peptidase (PLP)																														0.85
																														0.66
leucina aminopeptidase (LAP)																														0.60
																														0.65
manitol 1-fosfato desidrogenase (MIP)																														0.00
glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)																														0.93
																														0.66
																														0.42

ID = Cepas de dorso de língua do voluntário I; IP = Cepas de placa dental do voluntário I; IS = Cepas de saliva do voluntário I

Figura 19: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP e M1P para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário O



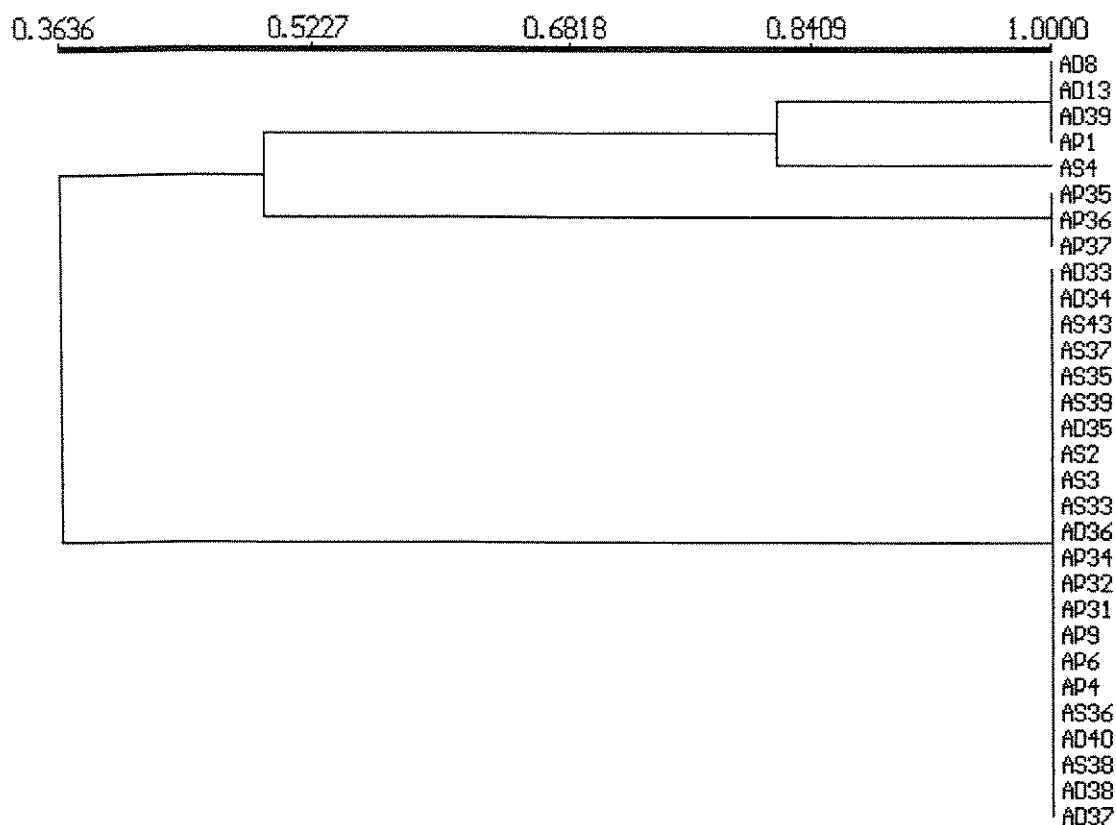
OD = Cepas de dorso de língua do voluntário O; OP = Cepas de placa dental do voluntário O; OS = Cepas de saliva do voluntário O

Figura 20: Eletroforegrama representativo dos perfis de migração das enzimas MPI, NSP, PLP, LAP, MIP e GOT para isolados de *Streptococcus mutans* obtidos a partir do dorso de língua, placa dental e saliva do voluntário R

Dorso de língua					Placa dental							Saliva											rf
RD1	RD2	RD5	RD6	RD7	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6	RP7	RS1	RS2	RS3	RS4	RS6	RS7	RS8	RS9	RS10	RS11		
manose fosfato isomerase (MPI)																							0.85
																							0.63
nucleosídio fosforilase (NSP)																							0.77
																							0.67
leucina aminopeptidase (LAP)																							0.84
																							0.84
manitol 1-fosfato desidrogenase (MIP)																							0.84
																							0.77
																							0.63
glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)																							0.86
																							0.76
																							0.57

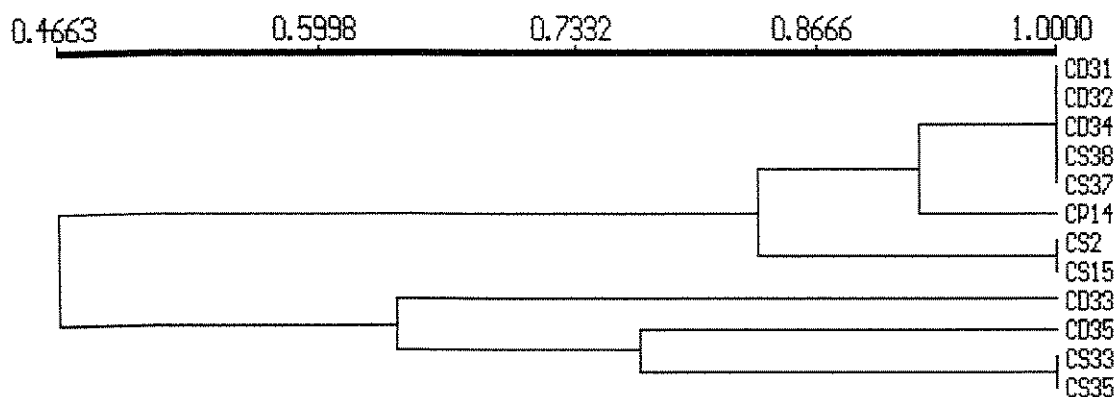
RD = Cepas de dorso de língua do voluntário R; RP = Cepas de placa dental do voluntário R; RS = Cepas de saliva do voluntário R

Figura 21: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário A, determinados pela MLEE



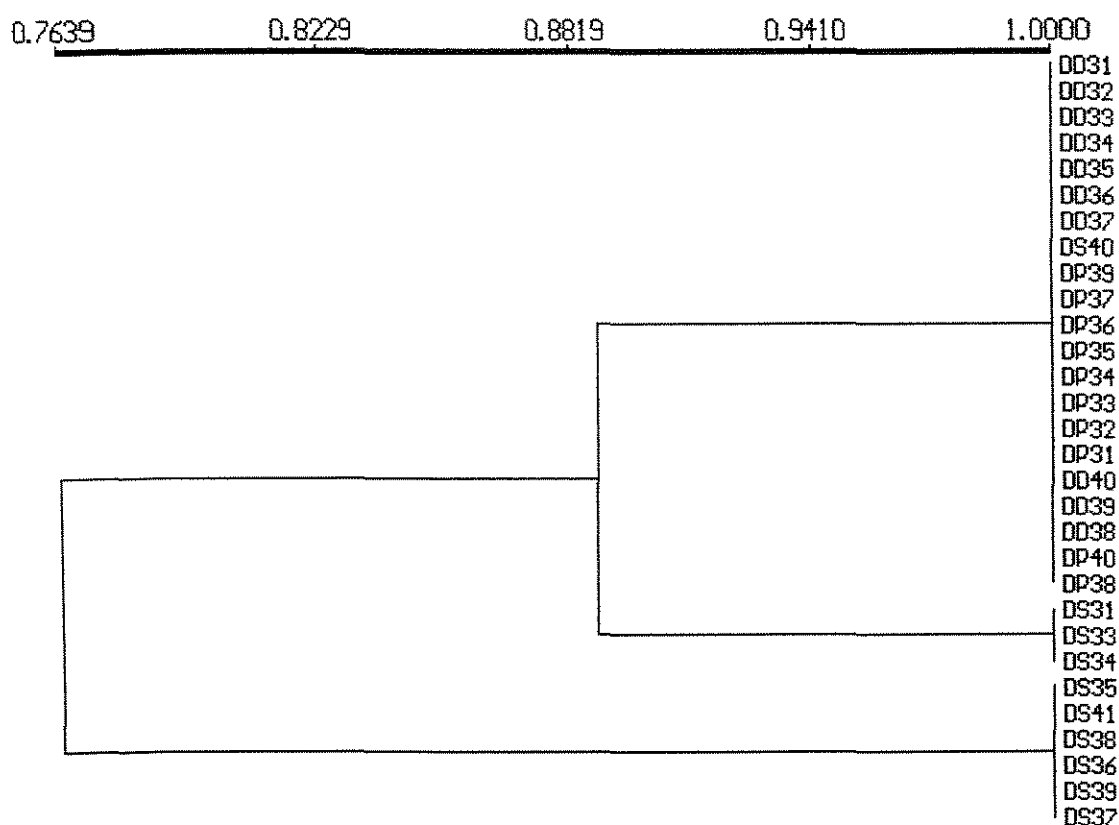
A FIG. 21 evidencia a ocorrência simultânea de quatro tipos genéticos de *S. mutans* na cavidade bucal do voluntário A. O clone predominante mostrou-se disperso nos diferentes pontos de colheita (dorso de língua, placa dental e saliva), sem concentrar-se num deles, em especial. Dois outros clones menores mostraram uma tendência de colonização sítio-específica para dorso de língua e placa bacteriana dental, respectivamente. Contudo, a cepa AP1, isolada de placa dental, mostrou máxima semelhança ($S_{SM} = 1,0000$) com os isolados do dorso de língua.

Figura 22: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C, determinados pela MLEE



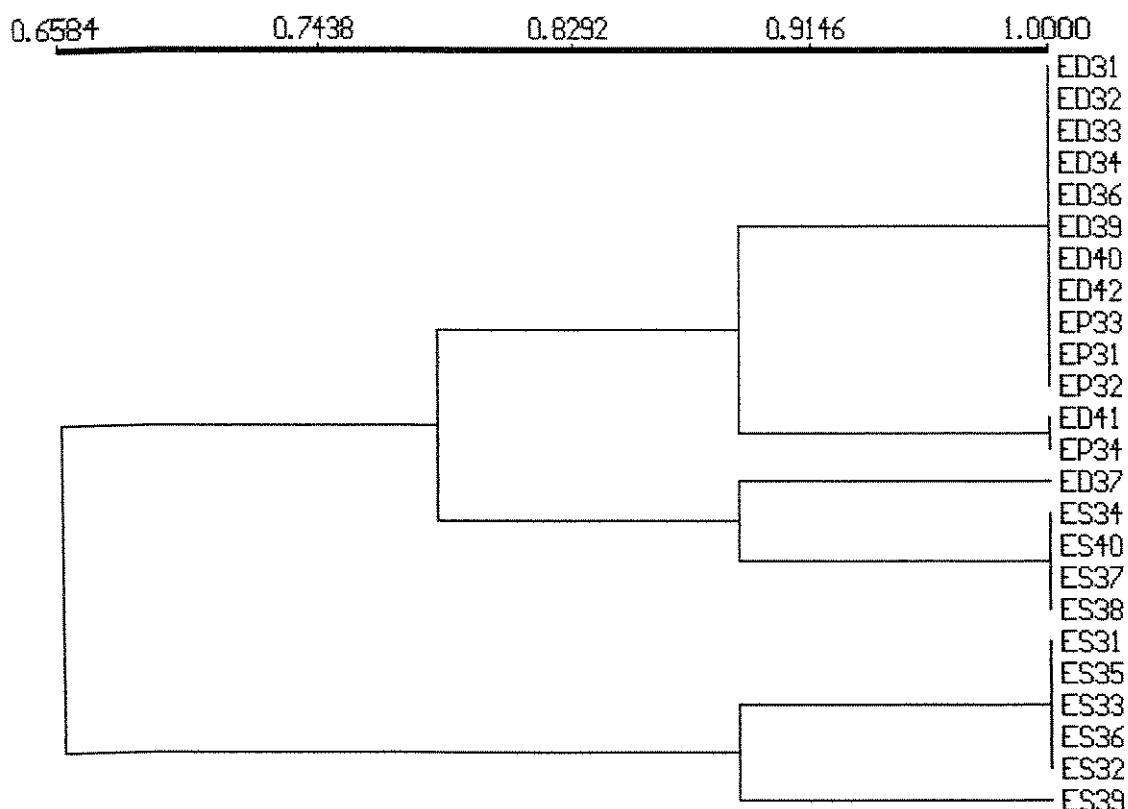
Na FIG. 22, pode ser observada a ocorrência simultânea de seis diferentes clones de *S. mutans* colonizando a cavidade bucal do voluntário C. O clone predominante, com 5/12 (41,6%) casos, mostrou-se concentrado no dorso de língua e na saliva. Outros clones menores mostraram-se dispersos, sem uma tendência de colonização sítio-específica. A partir da placa bacteriana dental, foi isolada uma única cepa (cepa CP14) que apresenta alta similaridade ($S_{SM} = 0,9230$) com os isolados do clone de maior incidência. Isso foi devido à detecção de uma banda de GOT de valor $R_f = 0,44$, diferente daquelas de $R_f = 0,56$ do clone principal.

Figura 23: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário D, determinados pela MLEE



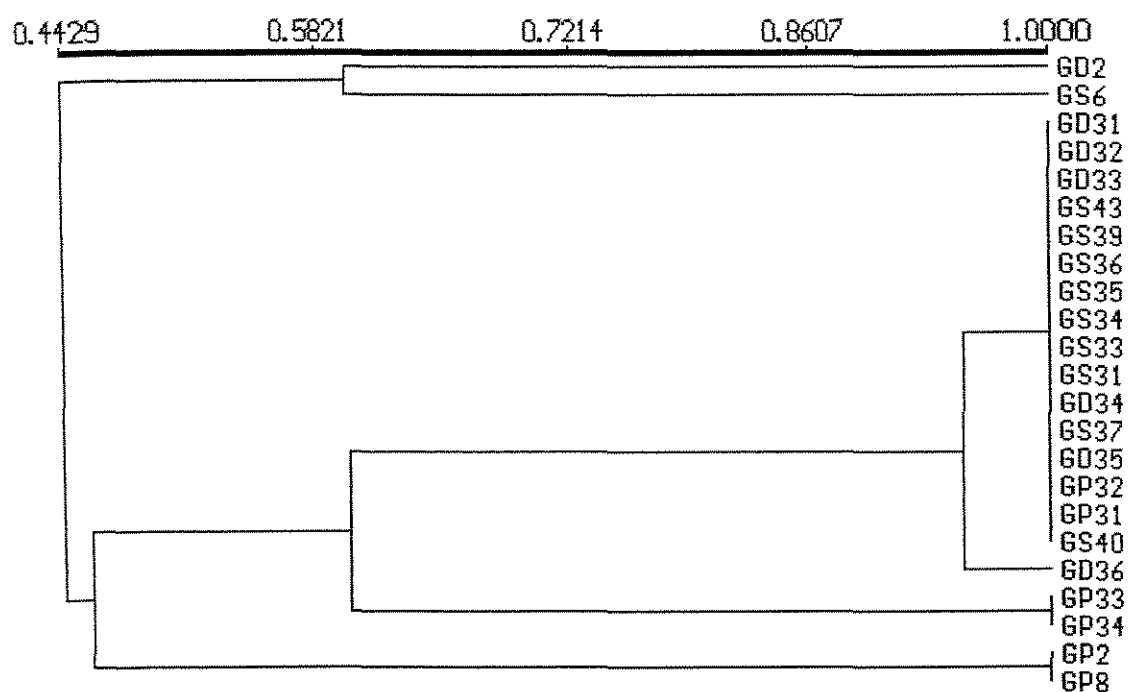
Uma colonização por três diferentes clones pode ser observada na FIG. 23, que é representativa do polimorfismo enzimático para *S. mutans* do voluntário D. O clone dominante numérico, com 21/30 (70,0%) isolamentos, mostrou-se colonizador absoluto do dorso de língua e da placa dental, além de ser também encontrado na saliva (um isolamento). Outros dois clones menores mostraram-se coexistentes na saliva, sem apresentarem fixação a nenhum tecido estudado.

Figura 24: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário E, determinados pela MLEE



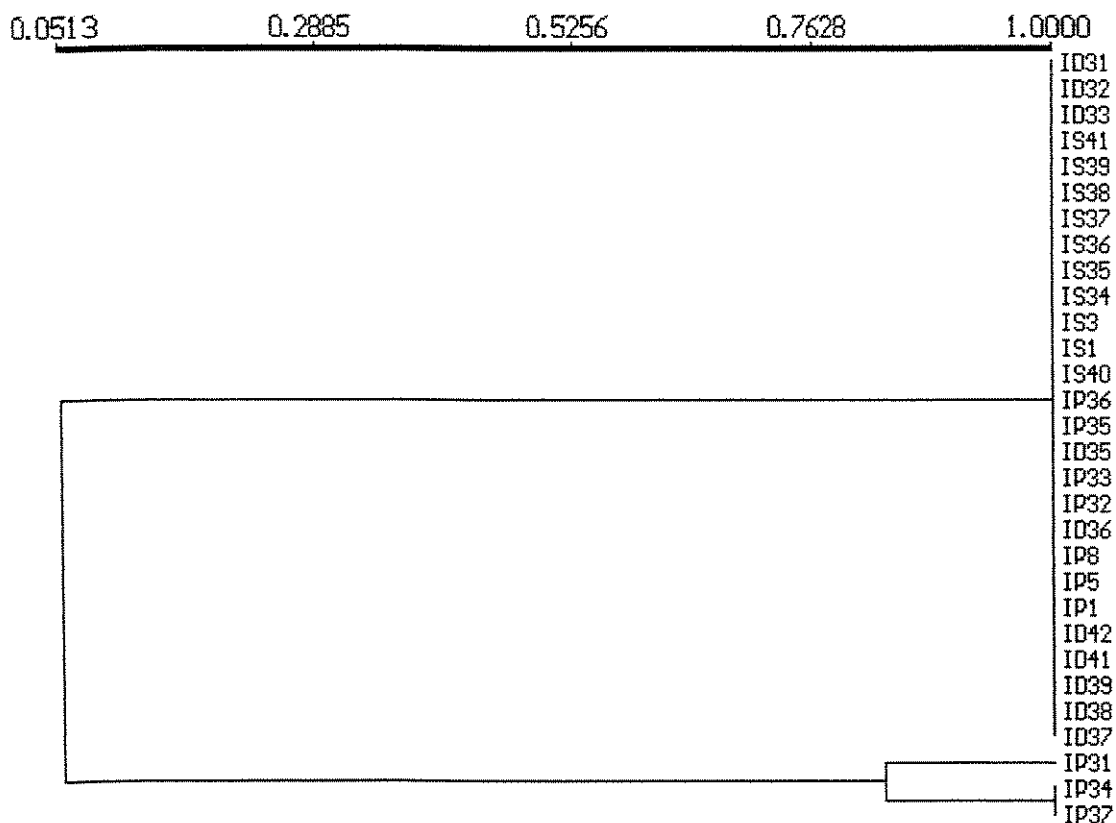
O clone que apresentou o maior número de isolamentos (11/24) a partir da microbiota bucal do voluntário E, conforme mostrado na FIG. 24, foi a variante de *S. mutans* colonizadora predominante das superfícies do epitélio lingual e das placas dentais, dentre os estreptococos cariogênicos. Outros dois clones mostraram-se detectáveis apenas na saliva, sem mostrar adesão a qualquer espécie de superfície.

Figura 25: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário G, determinados pela MLEE



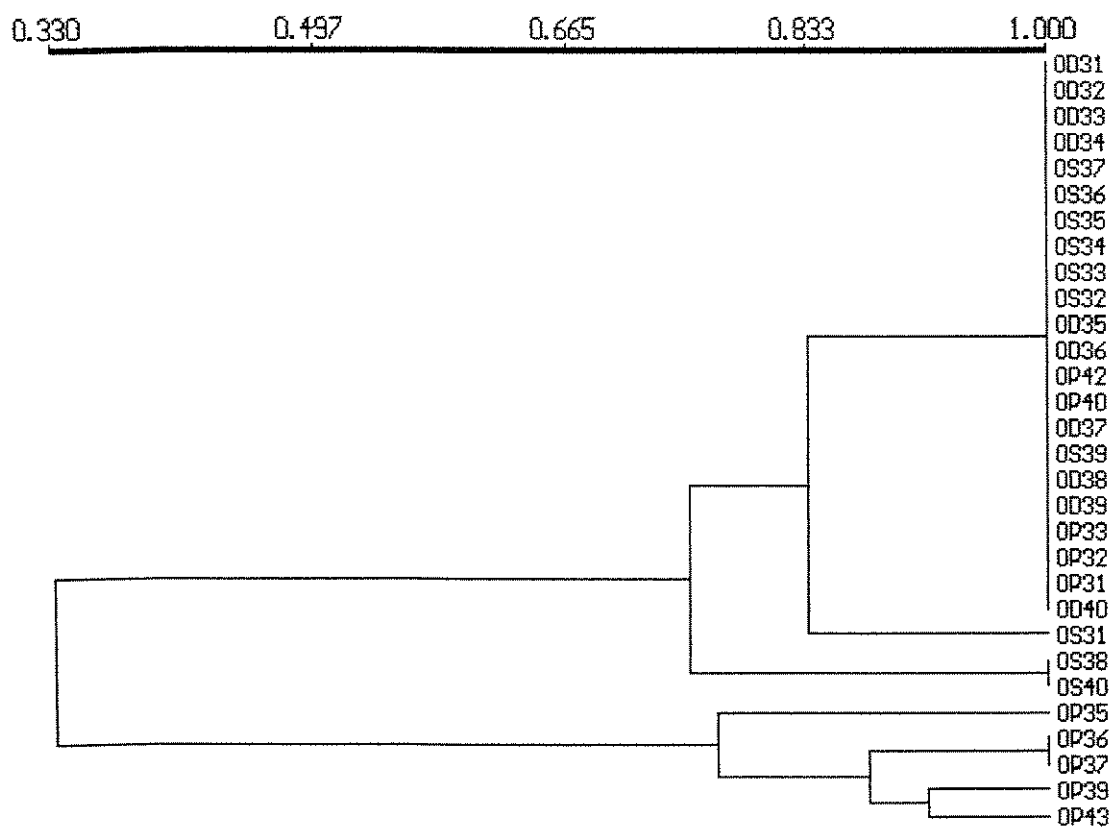
Tanto o eletroforegrama da FIG. 17, quanto o fenograma da FIG. 25, mostram a prevalência de uma variante clonal dispersa e passível de isolamento dentre a maioria das cepas de *S. mutans* obtidas da cavidade bucal do voluntário G. Os sítios que apresentaram maior pluralidade de isolamentos foram a placa dental e o dorso de língua, ambos com três clones. No momento da amostragem, a saliva do voluntário albergava dois clones, sendo um deles o dominante numérico e o outro, um clone não relacionado ($S_{SM} = 0,4430$).

Figura 26: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário I, determinados pela MLEE



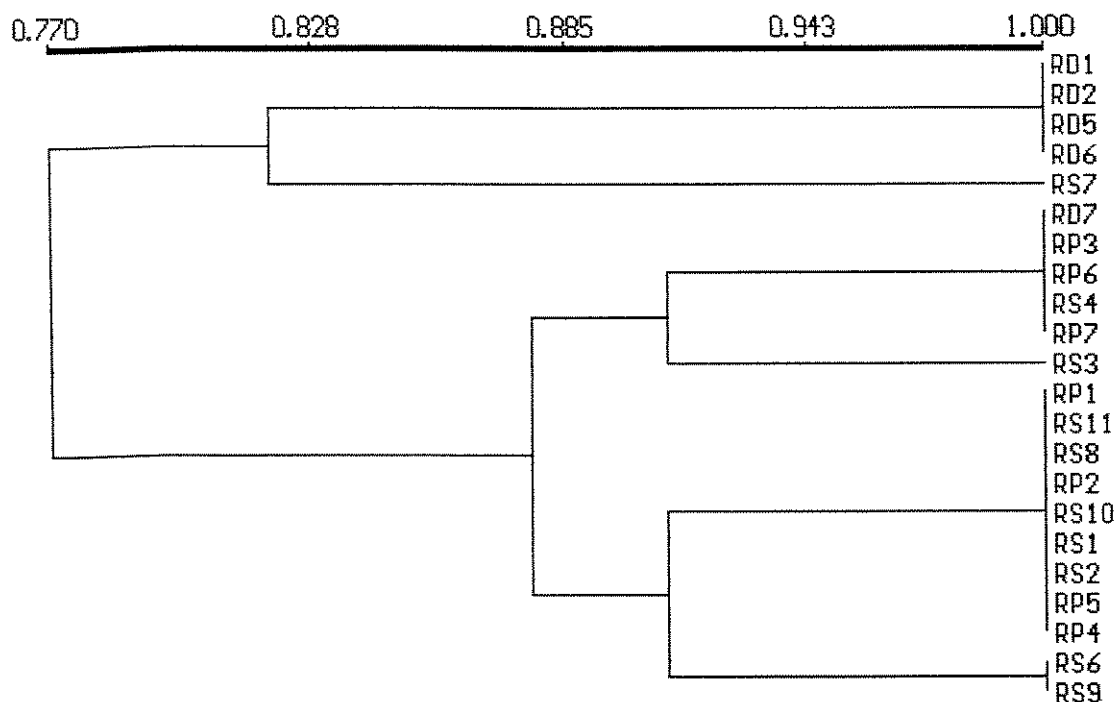
Dentre os três tipos genéticos de *S. mutans* detectados na cavidade bucal do voluntário I, um deles se sobressai em relação aos demais, como dominante numérico. Esse clone é encontrado em todos os sítios intra-bucais analisados (FIG. 18). Os outros dois clones encontram-se muito distanciados desse, com $S_{SM} = 0,0513$. A pequena divergência existente entre esses dois clones “menores” ($S_{SM} = 0,8330$) é derivada da não-expressão de um *locus* de GOT (FIG. 26).

Figura 27: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário O, determinados pela MLEE



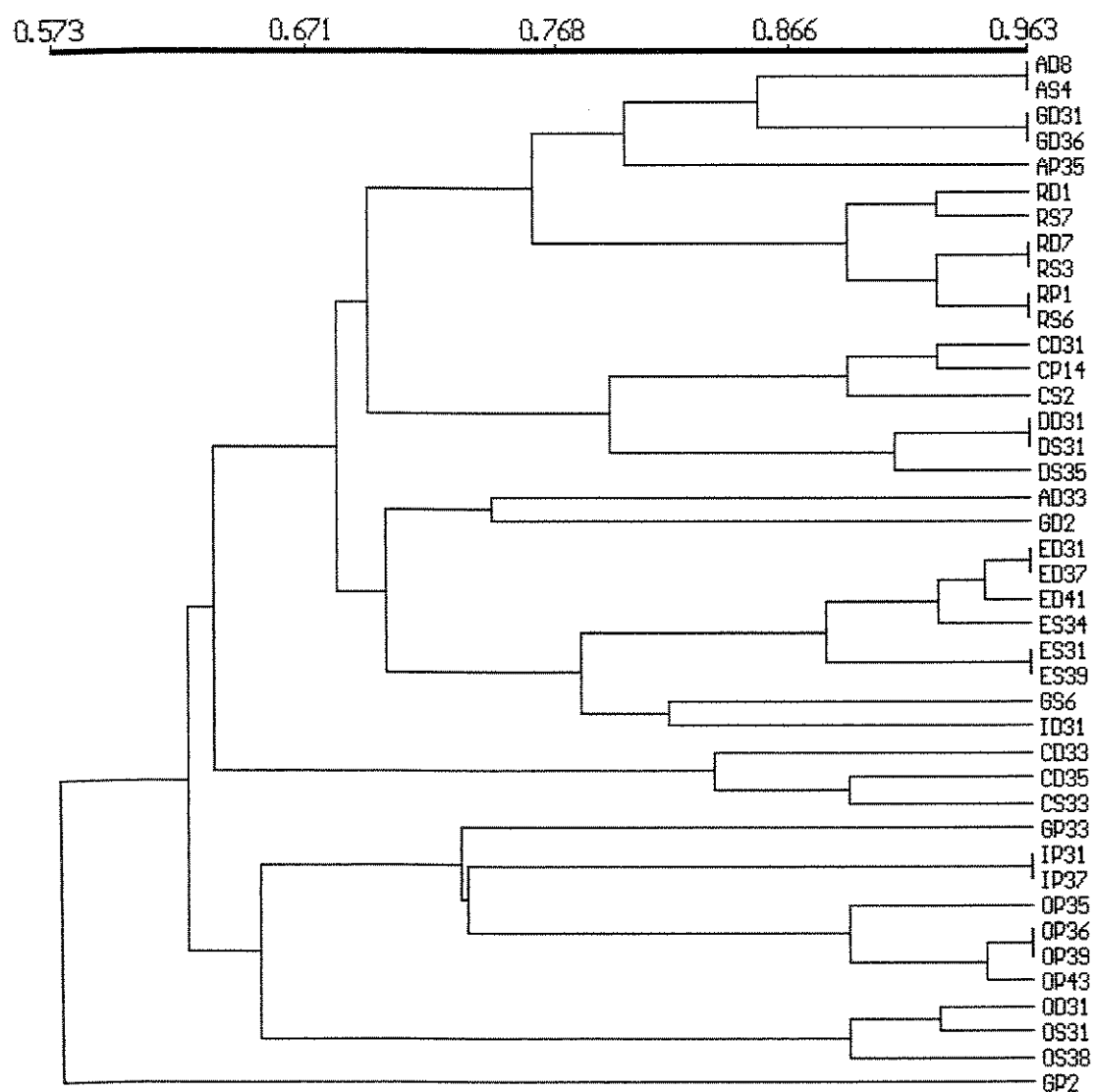
O extenso polimorfismo enzimático detectado nos isolados de *S. mutans* da placa dental e da saliva do voluntário O (FIG. 19) levou a construção de uma árvore de similaridade com sete variantes genéticas da bactéria (FIG. 27). Apesar desse relativo número de clones, um deles apresenta-se como o predominante, amplamente distribuído (22/30) nos três sítios de colheita. Parte dos outros clones apresenta uma certa semelhança entre si, principalmente alguns oriundos da placa dental ($S_{SM} \geq 0,7700$).

Figura 28: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos idênticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário R, determinados pela MLEE



O dendrograma representado na FIG. 28 apresenta a formação de quatro agrupamentos (*clusters*) de isolados com similaridade máxima ($S_{SM} = 1,0000$) e duas linhagens de *S. mutans* não-emparelhadas (RS3 e RS7). Esses agrupamentos representam diferentes clones que encontravam-se espalhados pela cavidade bucal do voluntário R segundo uma tendência sitio-inespecífica, mesmo com a existência de um clone sendo recolhido quase que exclusivamente do dorso de língua.

Figura 29: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos de *Streptococcus mutans* ocorrendo nas cavidades bucais dos voluntários determinados pela MLEE



Após a determinação dos perfis MLEE de *S. mutans* de todos os voluntários foi construído um dendrograma (FIG. 29) onde foi tomado um representante de cada clone. O acesso aos *clusters* mostrou que o valor de similaridade máxima ($S_{SM} = 0,9630$) foi verificado somente entre tipos clonais oriundos do mesmo voluntário.

Pode-se observar na TAB. 3 o total de perfis genéticos encontrados na cavidade oral dos voluntários, onde nota-se a ocorrência de 3 a 7 variações clonais nos diferentes indivíduos.

Tabela 3: Total de cepas de *Streptococcus mutans* analisadas pela MLEE e total de perfis genéticos encontrados em 8 voluntários.

	Voluntários							
	A	C	D	E	G	I	O	R
Perfis por Voluntários	4	6	3	6	6	3	7	6
Total de cepas pesquisadas	30	12	30	24	23	30	30	22

6 DISCUSSÃO

O fato de que os cocos reunidos sob a denominação “estreptococos grupo mutans” constituem a principal porção da microbiota envolvida nos mais variados processos cariogênicos já está firmemente consolidado, conforme a ampla aceitação por parte da comunidade acadêmica (ZICKERT *et al.*, 1983; TANZER, 1995; van PALESTEIN-HELDERMAN *et al.*, 1996; CAUFIELD, 1997). Dentre os diferentes membros desse grupo, a espécie melhor representativa do potencial patogênico é, sem sombra de dúvidas, o *S. mutans*, conforme as conclusões de PEREIRA *et al.* (2000).

Das amostras obtidas, foi possível o isolamento de estreptococos grupo mutans em 100% dos sítios pesquisados; resultado que diverge daqueles obtidos por WALTER & SHKLAIR (1982), que não detectaram a presença de *S. mutans* em aproximadamente 20% dos elementos livres de cárie, ao passo que foi possível o isolamento dessas bactérias em todos indivíduos de um grupo de cárie-ativos. Esses resultados, demonstram que mesmo nos voluntários livres de cárie, o isolamento dos estreptococos grupo mutans é uma constante e que, portanto, a mera presença desse grupo de microrganismos na cavidade bucal não deve refletir em evidente atividade de cárie.

No levantamento por nós conduzido, a identificação dos estreptococos grupo mutans, com base nas características morfológicas e bioquímicas, permitiu a classificação dos 668 isolados em cinco espécies: *S. mutans* (70,36%), *S. sobrinus* (13,47%), *S. cricetus* (7,19%), *S. rattus* (4,94%) e *S. ferus* (4,04%). Não foram isoladas cepas de *S. downei* ou *S. macacae*, o que estabelece uma concordância com os achados de SPOLIDORIO (1997), que também relatou o isolamento das cinco primeiras espécies na cavidade oral de escolares brasileiros.

Além de serem as espécies mais comumente isoladas, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram também aquelas predominantes na saliva (200 e 72 isolados, respectivamente), ao passo que na placa dental, a predominância foi de *S. mutans* seguido de *S. rattus* (128 e 21 isolados, respectivamente) e no dorso de língua, a predominância foi de *S. mutans* e *S. cricetus* (142 e 18 isolados, respectivamente). Tais resultados são importantes à medida que tem se isolado mais freqüentemente *S. mutans* e *S. sobrinus* (BEIGHTON *et al.*, 1987; KÖHLER & BJARNASSON, 1987; LINDQUIST & EMILSON, 1991b; AHMADY *et al.*, 1993; HIROSE *et al.*, 1993), creditando aos mesmos uma importância maior no processo cariogênico.

A observação de que os diferentes nichos intra-buciais encontravam-se colonizados por diferentes combinações de espécies altamente relacionadas fenotipicamente (GRÖNROOS, 2000), sugere a hipótese de que poderia ocorrer simultaneamente uma co-colonização por diferentes clones de uma mesma espécie, a qual tem sido investigada através da análise do perfil de enzimas constitutivas, também conhecidas como isoenzimas. Tal tipo de análise permite a obtenção de padrões de bandeamento espécime-específicos (*fingerprints*) e está consolidada na literatura envolvendo bactérias (SELANDER & LEVIN, 1980; SELANDER *et al.*, 1985; SELANDER *et al.*, 1986; MUSSER *et al.*, 1986; HÖFLING *et al.*, 1997), fungos leveduriformes (HÖFLING & ROSA, 1999; ROSA *et al.*, 1999; ROSA *et al.*, 2000a; ROSA *et al.*, 2000b) e mesmo protozoários (MELONI *et al.*, 1988).

Os eletroforegramas (FIG. 13 a 20) mostram uma relativa variedade nos perfis de expressão de bandas enzimáticas, denotando a existência, ao menos no momento das coletas, de múltiplos tipos genéticos de *S. mutans* fazendo parte da microbiota bucal dos

voluntários. Após o tratamento numérico pelo coeficiente de associação *Simple Matching* e pelo algoritmo UPGMA, os dendrogramas gerados (FIG. 21 a 28) permitiram a detecção de 3-7 (média = 5,12) clones da bactéria ocorrendo nos diferentes voluntários. A observação de estes estavam colonizados por mais de um tipo genético de *S. mutans* discordam, em princípio dos achados de ALALUUSUA *et al.* (1994), que detectaram a ocorrência de um único ribotipo da espécie bacteriana por indivíduo, que se repetia por dois anos seguidos. Cabe salientar que a população avaliada naquele estudo era composta de crianças com 5 anos de idade acompanhadas até os 7 anos de idade, com uma amostragem significativamente menor que o analisado em nosso levantamento. Os autores reconhecem em seu trabalho que o número de amostras por criança era pequeno e que uma amostragem melhor representativa, com o envolvimento de uma maior quantidade de isolados, poderia elevar o número de variantes geneticamente distintas de *S. mutans* por criança. Outro fator que pode conduzir à uma melhor compreensão da discordância entre os nossos resultados e aqueles obtidos pelo grupo finlandês está relacionado às diferenças nas faixas etárias das populações amostradas. Enquanto em sua publicação, ALALUUSUA *et al.* (1994) avaliaram crianças na primeira infância, a pesquisa que aqui se apresenta foi levada a termo com um grupo de voluntários na faixa de 17-21 anos de idade, cuja possibilidade de aquisição de clones extra-familiares é sensivelmente maior (CAULFIELD *et al.* 1988; CAULFIELD, 1997), com esses indivíduos, inclusive, já tendo passado pelas ditas “janelas de infectividade” (CAUFIELD *et al.*, 1991; CAUFIELD *et al.*, 1993). Numa outra publicação, ALALUUSUA *et al.* (1996) relataram novamente a monocolonização por um único ribotipo de *S. mutans* em crianças livres de cáries. Porém, os mesmos autores levantaram a hipótese de que poderiam estar detectando um ribotipo primário, e que outros

clones, caso eles também existissem, estariam abaixo do nível de detecção ou sua proporção nas amostras era baixa.

Assim, fatores como: tipo de metodologia empregada, idade da amostra e marcadores genéticos empregados, podem ser fatores limitantes quando se deseja comparar dados obtidos por outros autores, nesta mesma linha de investigação. A multicolonização detectada nos dendrogramas (FIG. 21 a 28) leva a uma concordância com os resultados publicados por outros grupos de pesquisadores que trabalharam com pacientes pediátricos, tais como KULKARNI *et al.* (1989). Já em mulheres adultas, com idades variando entre 18 e 34 anos, a diversidade genética de *S. mutans* foi determinada pela ribotipagem por GRÖNROOS *et al.* (1998), que obtiveram 1-4 (média = 2,05) clones por indivíduo. Contudo, nós não pudemos traçar qualquer paralelo acerca da saúde dentária dessas mulheres e dos nossos voluntários, pois, os índices de cárie das primeiras não estavam disponibilizados na publicação.

A proposição da simultânea multicolonização bucal por *S. mutans* foi anteriormente apresentada por GRÖNROOS (2000). Entretanto, os indivíduos cuja microbiota foi analisada eram crianças que haviam procurado o serviço odontológico para tratamento de cáries dentárias. Essa observação vem em favor de nossos resultados, uma vez que essa autora detectou a ocorrência de diferentes perfis AP-PCR para *S. mutans* isolado do biofilme que revestia diferentes dentes de um mesmo paciente. Em nosso experimento, foi empregado um *pool* placa por voluntário, o que deve ter juntado os clones bacterianos oriundos dos diferentes dentes.

A constatação de que um mesmo clone de *S. mutans* não tende a ocorrer nas cavidades bucais de indivíduos sem proximidade familiar, apresentada na FIG. 29, está em

concordância com os achados de CAUFIELD & WALKER (1989), LI & CAUFIELD (1995) e CAUFIELD (1997). Os autores relatam que conduziram comparações dos *fingerprints* de DNA cromossômico bacteriano observando que dois isolados provenientes de dois indivíduos não eram genotipicamente o mesmo, à exceção dos casos de pares mãe-filho e irmão-irmão.

O estabelecimento de qualquer correlação existente entre índices de cárie e número de clones de *S. mutans* ou de qualquer outra espécie cariogênica de estreptococo grupo mutans deve levar em consideração outras variáveis que podem influir na interpretação. De acordo com van PALESTEIN-HELDERMAN *et al.* (1996), diferenças na experiência de cárie são melhor explicadas em função dos hábitos dietéticos do indivíduo que pela espécie bacteriana envolvida. A variabilidade bacteriana, expressa em número de clones, pode não ser tão determinante em indivíduos livres de cáries e uma melhor avaliação dietética deveria ser conduzida. ALALUUSUA *et al.* (1996) ressaltam que a existência de múltiplos tipos genéticos bacterianos na placa pode ser uma mera consequência de circunstâncias favoráveis à colonização de estreptococos grupo mutans, muito embora seja possível que a ação simultânea de algumas cepas com potenciais cariogênicos diversos possa elevar o risco às cáries.

Além da dieta, a higiene bucal, que supostamente é melhor conduzida no grupo de voluntários escolhido (estudantes de Odontologia), é outro fator que merece consideração, quando se relaciona polimorfismo genético com experiência de cárie. É possível que indivíduos “bons controladores de placa” mantenham a população de estreptococos cariogênicos controlada abaixo das concentrações sujeitas aos fenômenos de *quorum sensing*, com expressão de mutacinas. Tal possibilidade contribuiria no entendimento da

relativa diversidade genética de *S. mutans* observada em determinados voluntários, uma vez que a pressão seletiva exercida pelas mutacinas seria diminuída, possibilitando a colonização por novas variantes genéticas.

A detecção do polimorfismo genético de *S. mutans* presentes na cavidade oral de indivíduos livres de cárie, indicam a necessidade de maiores estudos comparativos, inclusive, com indivíduos cárie-ativos, desejo futuro de nossas pesquisas. Os fatores limitantes descritos anteriormente, como: experiência de cárie, idade da amostragem e produção de substâncias exógenas por esses microrganismos, poderão ser melhor entendidos, em conjunto com os vários relatos da literatura.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos em nossa pesquisa, permitem concluir que:

1. A análise comparativa dos perfis isoenzimáticos pelo método *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), permite a detecção do polimorfismo genético de *S. mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos livres de cárie (CPOD = 0);
2. As espécies de estreptococos grupo mutans mais frequentemente isoladas do epitélio que recobre o dorso de língua, do biofilme que recobre o esmalte dentário e da saliva de indivíduos “livres de cáries” são, respectivamente, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus rattus* e *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*;
3. Nas amostras provenientes destes ecossistemas bucais analisados, estão presentes múltiplos tipos genéticos de *S. mutans*
4. Não se detecta a presença simultânea de um mesmo tipo clonal de *Streptococcus mutans* em dois indivíduos distintos e sem qualquer grau de parentesco;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALTONEN, A.S.; TENOVUO, J. Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: a cohort study. **Pediatr Dent** 16: 110-115, 1994.
2. AALTONEN, A.S.; TENOVUO, J.; LEHTONEN, O-P.; SAKSALA, R.; MEURMAN, O. Serum antibodies against oral *Streptococcus mutans* in young children in relation to dental caries and maternal close-contacts. **Archs Oral Biol** 30: 331-335, 1985.
3. AHMADY, K.; MARSH, P.D.; NEWMAN, H.N.; BULMAN, J.S. Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* at sub-sites in human approximal dental plaque. **Caries Res** 27: 135-139, 1993.
4. ALALUUSUA, S. Transmission of mutans streptococci. **Proc Finn Dent Soc** 87: 443-447, 1991.
5. ALALUUSUA, S.; ALALUUSUA, S.J.; KARJALAINEN, J.; SAARELA, M.; HOLTINEN, T.; KALLIO, M.; HÖLTÄ, P.; TORKKO, H.; RELANDER, P.; ASIKAINEN, S. The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. **Archs Oral Biol** 39: 467-471, 1994.
6. ALALUUSUA, S.; MATTO, J.; GRÖNROOS, L.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Archs Oral Biol** 41: 167-73, 1996.
7. ALALUUSUA, S.; MYLLÄRNIEMI, S.; KALLIO, M. *Streptococcus mutans* infection level and caries in a group of 5-year-old children. **Caries Res** 23: 190-194, 1989a.
8. ALALUUSUA, S.; NYSTROM, M.; GRONROOS, L.; PECK, L. Caries-related microbiological findings in a group of teenagers and their parents. **Caries Res** 23: 49-54, 1989b.
9. ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 242p., 1991.

10. ANTHONY, U.; MUNSHI, A.K. Sibling versus maternal *S. mutans* levels as related to dental caries. **J Clin Pediatr Dent** 21: 145-150, 1997.
11. AZEVEDO, R.V.P. O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans". Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 110 p., 1988.
12. BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R.; THOMAS, H.E.C. The distribution of *S. mutans* serotypes and dental caries in a group of 5 to 8 year old Hampshire schoolchildren. **Br Dent J** 162: 103-106, 1987.
13. BERKOWITZ, R.J.; JONES, P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. **Archs Oral Biol** 30: 377-379, 1985.
14. BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. **Archs Oral Biol** 20: 171-174, 1975.
15. BOWDEN, G.H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol** 25: 76-81, 1997.
16. BRATTHALL, D. A *Streptococcus mutans* Safari! **J Dent Res** 76: 1332-1336, 1997.
17. BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. **Odont Revy** 21: 143-152, 1970.
18. BROWN, J.P.; JUNNER, C.; LIEW, V. A study of *Streptococcus mutans* levels in both infants with bottle caries and their mothers. **Aust Dent J** 30: 96-98, 1985.
19. CAMLING, E.; KOHLER, B. Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. **Archs Oral Biol** 32: 817-823, 1987.
20. CARLÉN, A.; OLSSON, J.; BÖRJESSON, A.C. Saliva-mediated binding *in vitro* and prevalence *in vivo* of *Streptococcus mutans*. **Archs Oral Biol** 41: 35-39, 1996.
21. CARLSSON, J.; GRAHNEN, H.; JONSSON, G. Lactobacilli and streptococci in the mouths of children. **Caries Res** 9: 333-339, 1975.

22. CATALANOTTO, F.A.; SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. **J Am Dent Assoc** 91: 606-609, 1975.
23. CAUFIELD, P.W. Dental caries - a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatr Dent** 19: 491-498, 1997.
24. CAUFIELD, P.W.; CHILDERS, N.K.; ALLEN, D.; HANSEN, J.B. Distinct bacteriocins correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. **Infect Immun** 48: 51-56, 1985.
25. CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res** 72: 37-45, 1993.
26. CAUFIELD, P.W.; DASANAYAKE, A.P. Acquisition of *Streptococcus sanguis* in infants: a discrete window of infectivity. **J Dent Res** 75 (Special Issue): 94, 1996.
27. CAUFIELD, P.W.; HAGEN, T.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Infants acquire mutans streptococci from mothers during a discrete window. **J Dent Res** 70 (Special Issue): 367, 1991.
28. CAUFIELD, P.W.; RATANAPRIDAKUL, K.; ALLEN, D.N.; CUTTER, G.R. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implications in natural transmission. **Infect Immun** 56: 3216-3220, 1988.
29. CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **J Clin Microbiol** 27: 274-278 1989.
30. CAUFIELD, P.W.; WANNEMUEHLER, Y.M.; HANSEN, J.B. Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. **Infect Immun** 38: 785-787, 1982.
31. COWMAN, R.A.; BARON, S.S.; FITZGERALD, R.J.; STUCHELL, R.E.; MANDEL, I.D. Comparative growth responses of oral streptococci on mixed saliva or the separate submandibular and parotid secretions from caries-active and caries-free individuals. **J Dent Res** 62: 946-951, 1983.

32. COWMAN, R.A.; SCHAEFER, S.J.; FITZGERALD, R.J.; ROSNER, D.; SHKLAIR, I.L.; WALTER, R.G. Differential utilization of proteins in saliva from caries-active and caries-free subjects as growth substrates by plaque-forming streptococci. **J Dent Res** **58**: 2019-2027, 1979.
33. DAVEY, A.L.; ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Arch Oral Biol** **29**: 453-460, 1984.
34. EMANUELSSON, I.R.; LI, Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol Immunol** **13**: 271-277, 1998.
35. EMANUELSSON, I.R.; THORNQVIST, E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. **Caries Res** **34**: 133-139, 2000.
36. EMANUELSSON, I.R.; WANG, X.M. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. **Eur J Oral Sci** **106**: 788-794, 1998.
37. FACKLAM, R. R. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. **Appl Microbiol** **23**: 1131-1139, 1972.
38. FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J Am Dent Assoc** **61**: 9-19, 1960.
39. FUJIWARA, T.; SASADA, E.; MIMA, N.; OOSHIMA, T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent Oral Epidemiol** **19**: 151-154, 1991.
40. GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S.; KILIAN, M.; SELANDER, R.K. Genetic relationships among the oral streptococci. **J Bacteriol** **169**: 5247-5257, 1987.
41. GROENEVELD, A.; BACKER-DIRKS, O. Fluoridation of drinking water past, present and future. In: EKSTRAND, J.; FEJERSKOV, O. & SILVERSTONE, L.M. **Fluoride in dentistry**. Munksgaard, Copenhagen, 229-251, 1988.
42. GRÖNROOS, L. **Quantitative and qualitative characterization of mutans *Streptococci* in saliva and in the dentition**. Academic dissertation – Faculty of Medicine of the University of Helsinki, Helsinki, Finland, 80pp, 2000.

43. GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res** 34: 474-480, 2000.
44. GRÖNROOS, L.; SAARELA, M.; MATTO, J.; TANNER-SALO, U.; VUORELA, A.; ALALUUSUA, S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. **Infect Immun** 66: 2595-2600, 1998.
45. HAMADA, S.; MASUDA, N.; KOTANI, S. Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. **J Clin Microbiol** 11: 314-318, 1980.
46. HARDIE, J. M. Oral Streptococci. In: SNEATH, P.H.A; MAIR, N.S; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2., Williams & Wilkins, Baltimore, 1054-1063, 1986.
47. HAYES, M.L.; CARTER, E.C.; GRIFFITHS, S.J. The acidogenic microbial composition of dental plaque from caries-free and caries-prone people. **Archs oral Biol** 28: 381-386, 1983.
48. HIROSE, H.; HIROSE, K.; ISOGAI, E.; MIURA, H.; UEDA, I. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Carie Res** 27: 292-297, 1993.
49. HÖFLING, J.F.; ROSA, E.A.R. Main techniques employed on molecular epidemiology of *Candida* species. **Alpe-Adria Microbiol J** 8:5-23, 1999.
50. HÖFLING, J.F.; ROSA, E.A.R.; BAPTISTA, M.J.; SPOLIDÓRIO, D.M.P. New strategies on molecular biology applied to microbial systematics. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 39:345-352, 1997.
51. JOHNSON, N.W. Introduction: the nature of the caries process and the need for markers of risk, In: Risk markers for oral diseases, vol. I, Dental caries. Markers of high and low risk groups and individuals, Johnson NW, ed. Cambridge University Press: Cambridge, 1-12, 1991.
52. KEYES, P.H. Recent advances in dental caries research. Bacteriological findings and biological implications. **Int Dent J** 12: 443-464, 1962.

53. KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. **Archs Oral Biol** 29: 879-883, 1984.
54. KÖHLER, B.; BJARNASON, S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in the 11 and 12 year old Iceland children. **Community Dent Oral Epidemiol** 15: 332-335, 1987.
55. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. **Scand J Dent Res** 86: 35-42, 1978
56. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **J Clin Microbiol** 9: 584-588, 1979.
57. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Arch Oral Biol** 28: 225-231, 1983.
58. KORENSTEIN, K.; ECHEVERRI, E.A.; KEENE, H.J. Preliminary observations on the relationship between mutans streptococci and dental caries experience within black, white, and Hispanic families living in Houston, Texas. **Pediatr Dent** 17: 445-450, 1995.
59. KOZAI, K.; NAKAYAMA, R.; TEDJOSONGKO, U.; KUWAHARA, S.; SUZUKI, J.; OKADA, M.; NAGASAKA, N. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. **Microbiol Immunol** 43: 99-106, 1999.
60. KRASSE, B.; EDWARDSSON, S.; SVENSSON, I.; TRELL, L. Implantation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. **Arch Oral Biol** 12: 231-236, 1967.
61. KREULEN, C.M.; DE SOET, H.J.; HOGVEEN, R.; VEERKAMP, J.S. Streptococcus mutans in children using nursing bottles. **ASDC J Dent Child** 64: 107-111, 1997.
62. KULKARNI, G.V.; CHAN, K.H.; SANDHAM, H.J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. **J Dent Res** 68: 1155-1161, 1989.

63. LI, Y.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J Dent Res** 74: 681-685, 1995.
64. LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. **Caries Res** 25: 146-152, 1991a.
65. LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Interactions between and within *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolated from humans harboring both species. **Scand J Dent Res** 99: 498-504, 1991b.
66. MACRINA, F.L.; REIDER, J.L.; VIRGILI, S.S.; KOPECKO, D.J. Survey of the extrachromosomal gene pool of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun** 17: 215-226, 1977.
67. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev** 62: 71-109, 1998.
68. MATEE, M.I.; MIKX, F.H.; MASELLE, S.Y.; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H. Mutans streptococci and lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. **Caries Res** 26: 183-187, 1992.
69. MELONI, B.P.; LYMBERLY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. **Am J Trop Med Hyg** 38:65-73, 1988.
70. MUSSER, J.M.; HEWLETT, E.L.; PEPPLER, M.S.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* ssp. **J Bact** 166:230-237, 1986.
71. NEWBRUN, E. Preventing dental caries: breaking the chain of transmission. **JADA** 123: 55-59, 1992.
72. NIVEN JUNIOR, C.F.; SMILEY, K.L.; SHERMAN, J.M. The production of large amounts of a polysaccharide by *S. salivarius*. **J Bacteriol** 41: 479-484, 1942.
73. NYVAD, B.; KILIAN, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. **Caries Res** 24: 267-272, 1990.

74. PEREIRA, C.V.; ROSA, E.A.R.; SPOLIDÓRIO, D.M.P.; HÖFLING, J.F. Formación de placa bacteriana in vitro, polisacáridos extracelulares y producción de ácido por *Streptococcus mutans* de la cavidad oral. **Rev Fola Oral** 17: 34-40, 2000.
75. ROGERS, A.H. Evidence for the transmissibility of human dental caries. **Aust Dent J** 22: 53-56, 1977.
76. ROGERS, A.H. Bacteriocin typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from family groups. **Aust Dent J** 25: 279-283, 1980.
77. ROSA, E.A.R.; PEREIRA, C.V.; ROSA, R.T.; HOFLING, J.F. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis. **Int J Syst Evol Microbiol** 50:1343-1349, 2000a.
78. ROSA, E.A.R.; ROSA, R.T.; PEREIRA, C.V.; BORIOLO, M.F.G.; HOFLING, J.F. Analysis of parity between protein-based electrophoretic methods for the characterization of oral *Candida* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 95:801-806, 2000b.
79. ROSA, E.A.R.; ROSA, R.T.; PEREIRA, C.V.; HÖFLING, J.F. Evaluation of different dehydrogenases to recognize *Candida* species commonly isolated from human oral cavities. **Rev Argent Microbiol** 31:165 -172 , 1999.
80. SAARELA, M.; von TROIL-LINDEN, B.; TORKKO, H.; STUCKI, A.M.; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S. Transmission of oral bacterial species between spouses. **Oral Microbiol Immunol** 8: 349-354, 1993.
81. SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl Environ Microbiol** 51: 873-884, 1986.
82. SELANDER, R.K.; LEVIN, B.R. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. **Science** 210:545-547, 1980.
83. SELANDER, R.K.; MCKINNEY, R.M.; WHITTAM, T.S.; BIBB, W.F.; BRENNER, D.J.; NOLTE, F.S. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. **J Bact** 163:1021-1037, 1985.

84. SHKLAIR, I. L.; KEENE, H. J. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*. **Arch Oral Biol** 19: 1079-1081, 1974.
85. SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem J** 61: 629-641, 1955.
86. SNEATH, P.H.A.; SOKAL R.Q. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 482p, 1973.
87. SPOLIDÓRIO, D.M.P. **Biotipos de *Streptococcus* grupo mutans e avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos entre escolares de diferentes classes sócio-econômicas**. Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Piracicaba, Brasil, 131pp, 1997.
88. STILES, H.M.; MEYERS. R.; BRUNELLE, J.A.; WITIG, A.B. Occurrence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in the oral cavity and faeces of young children. In: STILES, H.M.; LOESCHE, W.J.; O'BRIEN, T.C. **Microbial aspects of dental caries. vol 1**, Information Retrieval Inc., Washington DC, 187-199, 1976.
89. SULLIVAN, Å.; BORGSTRÖM, M.K.; GRANATH, L.; NILSSON, G. Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. **Commun Dent Oral Epidemiol** 24: 159-163, 1996.
90. SULLIVAN, Å.; GRANATH, L.; WIDENHEIM, J. Correlation between child caries incidence and *S. mutans* / lactobacilli in saliva after correction for confounding factors. **Community Dent Oral Epidemiol** 17: 240-244, 1989.
91. TANZER, J.M. Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. **J Dent Res** 74: 1536-1542, 1995.
92. TWETMAN, S.; MATTIASSON, A.; VARELA, R.J.; BRATTHALL, D. Mutans streptococci in saliva and dental caries in children living in a high and a low fluoride area. **Oral Microbiol Immunol** 5: 169-171, 1990.
93. VAL, A.L; SCHWANTES A.R; SCHWANTES M.L.B.; DE LUCA P.H. Amido hidrolisado de milho como suporte eletroforético. **Ciênc Cultura** 33: 992-996, 1981.

94. van HOUTE, J.; YANOVER, L.; BRECHER, S. Relationship of levels of the bacterium *Streptococcus mutans* in saliva of children and their parents. **Arch Oral Biol** **26**:381-386, 1981.
95. van PALENSTEIN HELDERMAN, W.H.; MATEE, M.I.; VAN DER HOEVEN, J.S.; MIKX, F.H. Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. **J Dent Res** **75**:535-545, 1996.
96. WALTER, R.G.; SHKLAIR, I.L. *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active naval recruits. **J Dent Res** **61**: 1229-1232, 1982.
97. WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **J Gen Microbiol** **35**: 13-26, 1964.
98. ZICKERT, I.; EMILSON, C.G.; KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. **Infect Immun** **39**:982-985, 1983.

ANEXO

1 Meios para Cultura e Identificação

1.1 Meio Mitis Salivarius Bacitracina (MSB)

Mitis salivarius ágar	90g
Sacarose	150g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Aquecer o meio até ferver para dissolução completa. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C . Resfriar até 50-55°C. Adicionar a solução de Bacitracina (0,2U/mL) esterilizada por filtração (Membranas filtrantes Millipore com poro de 0,22µm). Dispensar em placas de Petri previamente esterilizadas.

1.2 Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI)

BHI	37g
Extrato de levedura	5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.3 Caldo de Infusão de Cérebro e Coração Glicerol a 10% (BHI-Glicerol 10%)

BHI	37g
Extrato de levedura	5g
Glicerol	100mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.4 Meio para identificação de Fermentação de Carboidratos

1.4.1 Meio Tioglicolato Ágar

Extrato de levedura	5g
Casitona	15g
L-cisteína	0,25g
Ágar bacteriológico	15g
Ácido tioglicólico	300µL
Manitol ou Melibiose ou Rafinose ou Sorbitol	10g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Solução de Púrpura de Bromocresol

Púrpura de Bromocresol	0,016g
Álcool etílico	1mL

Solubilizar a púrpura de bromocresol em álcool etílico.

Após dissolução dos componentes do meio de tioglicolato em água destilada, corrigir o pH para 7,0, acrescentar os substratos manitol ou sorbitol ou melibiose, na proporção de 1% respectivamente e a solução de bromocresol. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Para a rafinose, esterilizar previamente o meio base e o açúcar solubilizado em água destilada, deverá ser esterilizada por filtração (Membranas filtrantes Millipore com poros de 0,22µm). Distribuir os meios em placas de Petri.

1.4.2 Meio para identificação de Resistência à Bacitracina

O meio base de Tioglicolato Ágar para prova de fermentação de manitol deverá ser esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C. Resfriar até 50-55°C. Adicionar a solução de Bacitracina (2U/mL) esterilizada por filtração (Membranas filtrantes Millipore com poro de 0,22µm). Dispensar em placas de Petri previamente esterilizadas.

1.4.3 Meio para identificação da Hidrólise da Arginina

Extrato de levedura	5g
Triptona	5g
Fosfato dipotássico	2g
Glicose	0,5g
D-arginina HCl	3g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Solubilizar todos os componentes em água destilada e acertar o pH=7,2-7,4. Distribuir em tubos alíquotas de aproximadamente 2 mL. Autoclavar os tubos com meio por 15 minutos a 121°C. Inocular 0,1mL da cultura, incubar a 37°C por 48 horas. Após o crescimento pingar 2 gotas do Reativo de Nessler sobre a cultura. Observar aparecimento de coloração alaranjada.

Reativo de Nessler

Solução A:	Iodeto de potássio	27,6g
	Água destilada	5mL
Solução B:	Bicloreto de mercúrio	2,5g
	Água destilada	10mL
Solução C:	Hidróxido de potássio	15g
	Água destilada	30mL

Dissolver o iodeto de potássio em 5mL de água destilada (Sol. A)e, em seguida adicionar pouco a pouco a solução de bicloreto (Sol. B) dissolvida em banho-maria e adicionada a quente, para evitar precipitação ou dissolução não homogênea. Ao esfriar, acrescentar a solução de hidróxido de potássio (Sol. C) e água destilada até completar o volume de 100mL. Deixar a solução em descanso para decantação, sendo o sobrenadante acondicionado em frasco âmbar, fechado com rosca e conservado em ambiente fresco.

1.4.4 Meio para identificação de Produção de Peróxido de Hidrogênio

Extrato de carne	0,5g
Extrato de levedura	0,5g
Tween 80	0,05mL
Sulfato de manganês	0,01g
Ágar	1,5g
Água destilada	90mL

Solubilizar o meio, ajustar o pH para 7,2 e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para cada 90mL de meio acrescentar 5mL de uma solução de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada estéril misturadas em partes iguais, mais 5mL de outra solução de 0,1g de *o*-dianisidina em água destilada estéril. Aquecer a 100°C por 15 minutos. Dispensar em placas de Petri.

2 Soluções Tampão

2.1 Tampão Fosfato de Potássio 40 mM (pH 7,5)

KH_2PO_4	5,44g
água destilada	q.s.p. 1000mL

Ajustar o pH com solução concentrada de NaOH.

2.2 Tampão Fosfato de Potássio 0,1M pH 5,5

KH_2PO_4	13,6g
água destilada	q.s.p. 1000mL

Ajustar o pH com solução concentrada de NaOH.

2.3 Tampão Fosfato de Sódio pH7,0

Solução A:	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27,6g
	água destilada	q.s.p. 1000mL
Solução B:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	53,6g
	água destilada	q.s.p. 1000mL

Misturar partes iguais das soluções A e B e diluir a mistura 1:24 com água destilada.

2.4 Tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0

Tris	24,2g
água destilada	q.s.p. 1000mL

Ajustar o pH com HCl, até pH igual a 8.

2.5 Tampão A (Tris-Citrato pH 8,0)

Eletrodo:	Tris	83,2g
	Ác. cítrico . H ₂ O	33,09g
	Água destilada	q.s.p. 1000mL
	Ajustar o pH com ácido cítrico.	
Gel:	Tampão do eletrodo diluído 1:29.	

2.6 Tampão D (Hidróxido de Lítio)

Eletrodo:	Hidróxido de Lítio .H ₂ O	1,2g
	Ácido bórico	11,89g
	Água destilada	q.s.p. 1000mL
	Ajustar o pH com ácido bórico até 8,1.	
Gel:	Tris	6,2g
	Ácido cítrico .H ₂ O	1,6g
	Água destilada	q.s.p. 1000mL
	Misturar o Tampão do eletrodo 1:9 com o Tampão do gel, ajustar o pH=8,3.	

3 Soluções para revelação

3.1 MgCl_2 0,1M

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2,03g

água destilada

q.s.p. 100mL

3.2 MnCl_2 0,25M

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

4,95g

água destilada

q.s.p. 100mL

4 Sistemas de revelação

4.1 Transaminase glutâmico-oxalacética (GOT – E.C. 2.6.1.1)

Ácido L-aspártico	75mg
Piridoxal 5'-fosfato	2,5mg
Ácido α -cetoglutárico	50mg
Fast blue BB	50mg
Tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0	50mL

Incubar a 30⁰C, no escuro, até o aparecimento de bandas azuis, em fundo marrom.

4.2 Leucina amino peptidase (LAP – E.C. 3.4.1.1.)

L-leucina- β -naftilamida HCl	30mg
Black K	30mg
MgCl ₂ 0,1M	1mL
Tampão KH ₂ PO ₄ 0,1M pH 5,5	50 mL

Incubar a 30⁰C, no escuro, até o aparecimento de bandas escuras.

4.3 Manitol 1-fosfato desidrogenase (M1P – E.C. 1.1.1.17)

Manitol 1-fosfato	5mg
NAD	2mL
MTT	1mL
PMS	0,5mL
Tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0	50mL

Incubar a 30⁰C, no escuro, até o aparecimento de bandas escuras.

4.4 Manose fosfato isomerase (MPI – E.C. 5.3.1.8)

Manose 6-fosfato	20mg
Glucose 6-fosfato desidrogenase	20mg
Fosfoglucoase isomerase	100U
NAD	2mL
NADP	1mL
PMS	0,5mL
MTT	1mL
MgCl ₂ 0,1M	1mL
Tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,0	50mL
Incubar a 30 ⁰ C, no escuro, até o aparecimento de bandas escuras.	

4.5 Nucleosídio fosforilase (NSP – E.C. 2.4.2.1)

Inosina	40mg
Xantina oxidase	4U
MTT	1mL
PMS	0,5mL
Tampão Fosfato de Sódio pH 7,0	50mL
Incubar a 30 ⁰ C, no escuro, até o aparecimento de bandas escuras.	

4.6 Fenilalanil-leucina peptidase (PLP – E.C. 3.4.x.x)

Fenilalanil-leucina	20mg
Peroxidase	10mg
Snake venom	10mg
o-dianisidina 2HCl	10mg
MnCl ₂ 0,25M	0,5mL
Tampão Tris-HCl 0,2M pH 8	50mL
Incubar a 30 ⁰ C, no escuro, até o aparecimento de bandas escuras.	



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CEP — COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER DO CEP — FOP/UNICAMP

Comunicamos que o Protocolo de Pesquisa referente ao **Projeto No. 07/99:**

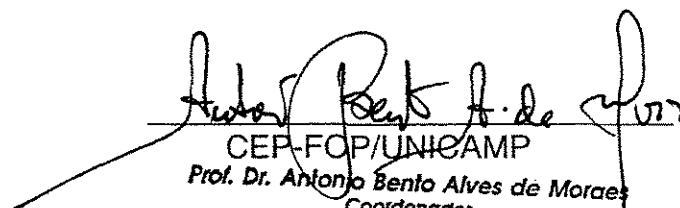
Titulo do Projeto de Pesquisa: Isolamento, identificação e detecção do polimorfismo genético dos streptococos do grupo mutans isolados da cavidade oral de universitários livres de cárie

Pesquisador Orientador/Orientado: Prof. Reginaldo Bruno Gonçalves / Rosemeire Takaki Rosa e Marcelo Henrique Napimoga

apresentado a este Comitê para análise ética, segundo a Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, de 10/10/96, e de acordo com cópia do projeto arquivada em nossa secretaria, foi considerado:

- ☒ [X] Aprovado, em reunião realizada em _07_/_04_/_99_.
☐ [] Aprovado com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação da análise do Projeto.
☐ [] Com pendência.
☐ [] Reprovado.

Análise e parecer do relator (com resumo do projeto): Observamos a ausência do cronograma de execução, devendo o mesmo ser anexado ao projeto. Do mais todas as solicitações anteriores foram atendidas, portanto consideramos o projeto APROVADO.


CEP-FOP/UNICAMP
Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador
CEP-FOP/UNICAMP